

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii*,  
*Neospora caninum*, haemotrophen Mykoplasmen und  
vektorübertragenen Pathogenen bei Polizeihunden aus Albanien

von Carina Alenka Schüle

aus Ludwigsburg

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Tag der Promotion: 16.07.2016

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die  
Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative  
Dissertation gestaltet

Für meine Eltern

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
1.	Vektoren	3
1.1.	Schildzecken ( <i>Ixodidae</i> )	3
1.1.1.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
1.1.2.	<i>Dermacentor reticulatus</i>	5
1.1.3.	<i>Ixodes ricinus</i>	5
1.2.	Mücken ( <i>Nematocera</i> )	6
1.2.1.	Sandmücken ( <i>Phlebotominae</i> )	6
1.2.2.	Stechmücken ( <i>Culicidae</i> )	6
2.	Ordnung <i>Rickettsiales</i>	7
2.1.	Spotted Fever Group Rickettsiae	7
2.1.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	7
2.1.2.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	8
2.1.3.	Vorkommen in Südosteuropa	9
2.2.	<i>Anaplasma</i> spp.	10
2.2.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	10
2.2.2.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	10
2.2.2.1.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
2.2.2.2.	<i>Anaplasma platys</i>	11
2.2.2.	Vorkommen in Südosteuropa	12
2.3.	<i>Ehrlichia canis</i>	13
2.3.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	13
2.3.2.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	13
2.3.3.	Vorkommen in Südosteuropa	14
3.	Kanine haemotrophe Mykoplasmen	14
3.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	14
3.2.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	15
3.3.	Vorkommen in Südosteuropa	15
4.	<i>Leishmania infantum</i>	16
4.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	16
4.2.	Entwicklung	17
4.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	17
4.4.	Vorkommen in Südosteuropa	18
5.	<i>Dirofilaria immitis</i>	20
5.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	20
5.2.	Entwicklung	20
5.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	20
5.4.	Vorkommen in Südosteuropa	21
6.	<i>Babesia</i> spp.	24
6.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	24
6.2.	Entwicklung	24
6.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	25

6.4.	Vorkommen in Südosteuropa	25
7.	<i>Hepatozoon canis</i>	27
7.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	27
7.2.	Entwicklung	27
7.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	27
7.4.	Vorkommen in Südosteuropa	28
8.	<i>Toxoplasma gondii</i>	29
8.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	29
8.2.	Entwicklung	29
8.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	30
8.4.	Vorkommen in Südosteuropa	31
9.	<i>Neospora caninum</i>	31
9.1.	Taxonomie und Wirtsspektrum	31
9.2.	Entwicklung	32
9.3.	Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund	33
9.4.	Vorkommen in Südosteuropa	33
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
1.	Hunde	34
2.	Geographie	35
3.	Laboruntersuchungen	36
3.1.	Direkter Pathogennachweis	36
3.1.1.	DNA-Isolierung	36
3.1.2.	Photometrische Qualitätskontrolle der DNA-Isolierung	36
3.1.3.	Polymerase Kettenreaktion	37
3.1.4.	ELISA	40
3.2.	Indirekter Pathogennachweis	40
3.2.1.	IFAT	40
3.2.2.	ELISA	42
4.	Statistik	43
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
1.	Publikation	45
2.	Weitere Ergebnisse der serologischen Untersuchung	81
2.1.	Seroprävalenzen in den Geschlechtergruppen	81
2.2.	Auf vektorübertragene Pathogene seronegativ getestete Polizeihunde	82
2.3.	Statistische Auswertung	82
2.3.1.	Bivariate Analyse	82
2.3.1.1.	Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und seropositiven Hunden	82
2.3.1.2.	Zusammenhang zwischen der Altersgruppe und seropositiven Hunden	83
2.3.1.3.	Zusammenhang zwischen seropositiven Hunden und deren Herkunft	83
2.3.1.4.	Zusammenhang zwischen dem serologischen Nachweis zweier vektorübertragener Pathogene	83
2.3.1.5.	Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Antikörpern gegen die Protozoen <i>T.</i>	

---

<i>gondii</i> , <i>N. caninum</i> und <i>L. infantum</i>	84
2.3.2. Multivariate Analyse (multiple logistische Regression)	85
<b>V. DISKUSSION</b>	<b>89</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>113</b>
<b>VII. SUMMARY</b>	<b>115</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>117</b>
<b>IX. ANHANG</b>	<b>162</b>
1. Material	162
1.1. Geräte	162
1.2. Kits	162
1.3. Nukleotide, Primer, Polymerasen	163
1.4. Chemikalien	163
1.5. Verbrauchsmaterial	164
1.6. Sonstiges	164
<b>X. DANKSAGUNG</b>	<b>165</b>



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A.	Anzahl
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest	destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CGA	Canine Granulocytäre Anaplasiose
CK	Creatinkinase
CME	Canine Monozytäre Ehrlichiose
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
evtl.	eventuell
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGA	Humane Granulozytäre Anaplasiose

HGE	Humane Granulozytäre Ehrlichose
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
IgG	Immunglobulin G
J.	Jahre
k.A.	keine Angabe
KBR	Komplementbildungsreaktion
KI	Konfidenzintervall
L3	Larve 3
L5	Larve 5
LAR	Lymphangitis-Associated Rickettsioses
LKN	Lymphknoten
m.ü.NN	Meter über Normalnull
Min	Minute
ml	Milliliter
MMX	Mastermix
MSF	Mediterranean Spotted Fever
msp	Major surface protein
N.	Nordgruppe
nm	Nanometer
NT.	Nicht-Tirana-Gruppe
OD	Optische Dichte
OR	Odds Ratio
p.i.	post infectionem
pb	Basenpaar

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S.	Südgruppe
sek.	Sekunde
SENLAT	Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy
SFG	Spotted Fever Group
spp.	species pluralis
T.	Tiranagruppe
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus (thermophiles Bakterium)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.	und
u.a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
vs.	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar



## I. EINLEITUNG

Das Verbringen subklinisch infizierter Hunden in bisher nicht endemische Gebiete, das Reisen mit Hunden in endemische Gebiete, sowie die Veränderung von klimatischen Bedingungen scheinen in Europa zu einem Anstieg und einer größeren Verbreitung von vektorübertragenen Erkrankungen bei Hunden zu führen (Beugnet & Marié, 2009). Einige der diesen Erkrankungen zugrundeliegenden Pathogene stellen aufgrund ihres zoonotischen Charakters auch eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar (Otranto et al., 2009b). Um die Ausbreitung dieser Pathogene und die Infektionsgefahr für Mensch und Tier zu beurteilen, sind grundlegende Daten aus epidemiologischen Studien nötig.

Aus Albanien waren bis zum Jahr 2008, ausgenommen einiger weniger Untersuchungen zu *Leishmania infantum* und *Babesia canis*, keine Studien zu vektorübertragenen Erkrankungen bei Hunden veröffentlicht (Cricko et al., 1999; Dharmo et al., 2006; Lazri et al., 2008). Dann wurden die ersten Untersuchungen zum Auftreten von *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp, *Hepatozoon canis*, *Dirofilaria immitis* und *Mycoplasma haemocanis* bei Hunden aus Tirana und küstennahen Gebieten veröffentlicht (Hamel et al., 2009; Hamel et al., 2013; Lazri et al., 2008; Rapti & Rehbein, 2010). Die meisten der für die Übertragung der genannten Pathogene verantwortlichen Vektoren bevorzugen das mediterrane Klima der Küstenschwemmlandschaft Albaniens. Allerdings werden 70% des Landes von einer Gebirgslandschaft mit vorherrschend kontinentalem Klima eingenommen. Landesweite Studien, in die auch Hunde aus diesen Regionen mit einbezogen wurden, fehlen bisher. Zudem sind bisher keine Untersuchungen zur Exposition von Hunden mit Spotted Fever Group Rickettsien in Albanien durchgeführt worden. Da subklinisch infizierte Hunde ein mögliches Reservoir für die zoonotischen Pathogene *D. immitis*, *Rickettsia conorii*, *L. infantum* und *A. phagocytophilum* darstellen (Levin et al., 2012; Otranto et al., 2009b), sind speziell Polizeihunde aufgrund ihres häufigen Kontakts zum Menschen gut für eine Untersuchung zu deren Verbreitung geeignet. Durch ihre enge Zusammenarbeit sind Polizeihunde ähnlichen Umweltbedingungen wie ihre Halter ausgesetzt und ihre Untersuchung kann somit Rückschlüsse auf eine mögliche Infektionsgefahr für den Menschen zulassen. Zudem werden Polizeihunde als Arbeitstiere gut medizinisch betreut und unter ähnlichen Bedingungen gehalten. Ihre Untersuchung

kann weiterhin helfen, die Effektivität von Präventionsmaßnahmen gegen Vektoren einzuschätzen und diese Maßnahmen gegebenenfalls zu ändern.

Nicht nur zu den genannten vektorübertragenen Pathogenen gibt es wenige Studien aus Albanien, auch Daten zur Prävalenz von *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* stehen nur wenige zur Verfügung. Dabei hat *N. caninum* neben der veterinärmedizinischen Bedeutung auch einen wichtigen ökonomischen Einfluss auf die Viehwirtschaft, welche in Albanien einen wichtigen Wirtschaftssektor darstellt (Dubey & Schares, 2011). Bei *T. gondii* steht die Humanpathogenität des Parasiten im Vordergrund (Dubey, 2010). Vor kurzem wurde erstmals eine Studie zu diesem Thema bei Hunden aus Albanien veröffentlicht. Diese beschränkte sich jedoch auf Hunde aus Tirana (Hamel et al., 2013). Somit wird deutlich, dass in diesem Land zum Vorkommen der in der vorliegenden Studie untersuchten Pathogene noch große Wissenslücken bestehen. Daher waren die Ziele dieser Studie:

- (1) die Erfassung der Infektions- bzw. Seroprävalenz von *T. gondii*, *N. caninum*, haemotropher Mykoplasmen und verschiedener vektorübertragener Pathogene bei Polizeihunden aus Albanien;
- (2) die Evaluierung von Alter, Geschlecht und geographischer Herkunft der Tiere als mögliche Risikofaktoren;
- (3) und die Erfassung von Koinfektionen bzw. Koexpositionen.

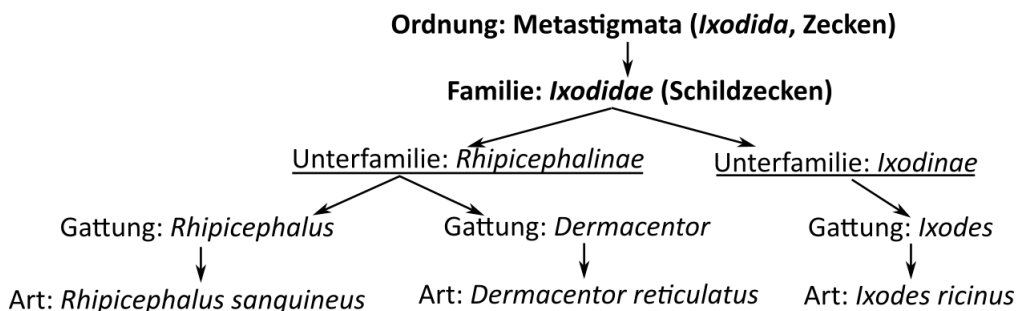
## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Vektoren

Die in dieser Studie behandelten Pathogene *Anaplasma* spp., Spotted Fever Group Rickettsien, *Babesia* spp., *Hepatozoon canis*, *Leishmania infantum* und *Dirofilaria immitis* werden alle von Arthropoden übertragen. Außer bei *H. canis*, bei dem es sich um einen phagär übertragenen Parasiten handelt, erfolgt die Übertragung inokulativ während der Blutmahlzeit (Deplazes et al., 2012). Vermutlich weisen auch die kaninen haemotrophen Mykoplasmen einen vektorgebundenen Infektionsweg auf, doch die natürlichen Übertragungswege dieser Bakterien sind bisher nur unzureichend erforscht (Willi et al., 2010).

#### 1.1. Schildzecken (*Ixodidae*)

Die für diese Arbeit relevanten Zeckenarten *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* sind alle der Familie der Schildzecken (*Ixodidae*) angehörig (Abb. 1). Pathogene, die von diesen Zeckenarten übertragen werden oder deren Überträgerstatus diskutiert wird, sind in Tab.1 aufgelistet.



**Abb. 1 Vereinfachte taxonomische Systematik von *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* modifiziert nach Deplazes et al., 2012**

**Tab. 1: Zeckenarten Europas und durch sie übertragene Pathogene <sup>1)</sup>**

Zeckenart	Pathogen	Überträgerstatus innerhalb der Zecke	Überträgerstatus auf Wirbeltierwirt	Referenz
<b><i>Rhipicephalus sanguineus</i></b>	<i>Rickettsia conorii</i> spp. <i>conorii</i>	Transovariale/trans-stadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Raoult & Parola, 2007; Socolovschi et al., 2009
	<i>Rickettsia conorii</i> spp. <i>capsia</i>	aus Zecke amplifiziert (gesaugt)	Nicht experimentell nachgewiesen	Fournier et al., 2003; Psaroulaki et al., 2003
	<i>Rickettsia conorii</i> spp. <i>israelensis</i>	Transstadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Levin et al., 2012; Zemtsova et al., 2010
	<i>Anaplasma platys</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Latrofa et al., 2014; Simpson et al., 1991
	<i>Ehrlichia canis</i>	Transstadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Groves et al., 1975
	<i>Babesia vogeli</i>	Transovariale/trans-stadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Chauvin et al., 2009; Hauschild & Schein, 1996
	<i>Babesia canis</i>	Transovariale/trans-stadiale Übertragung	Nicht experimentell nachgewiesen	Cassini et al., 2009; Iori et al., 2010
	<i>Hepatozoon canis</i>	Transstadiale Übertragung,	Experimentell nachgewiesen	Baneth et al., 2001
	<i>Mycoplasma haemocanis</i>		Experimentell nachgewiesen	Seneviratna et al., 1973
<b><i>Dermacentor reticulatus</i></b>	<i>Rickettsia slovaca</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Dobec et al., 2009
	<i>Rickettsia raoultii</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Wojcik-Fatla et al., 2013
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Paulauskas et al., 2012
	<i>B. canis</i>	Transovariale/trans-stadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Chauvin et al., 2009; Hauschild & Schein, 1996
	<i>Babesia microti</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Wojcik-Fatla et al., 2015
<b><i>Ixodes ricinus</i></b>	<i>Rickettsia helvetica</i>	Transovariale Übertragung	Nicht experimentell nachgewiesen	Burgdorfer et al., 1979; Radulovic et al., 2011
	<i>Rickettsia monacensis</i>	Aus Zecken amplifiziert	Nicht experimentell nachgewiesen	Radulovic et al., 2011
	<i>A. phagocytophilum</i>	Transstadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	MacLeod & Gordon, 1933; Ogden et al., 2003
	<i>B. microti</i>	Transstadiale Übertragung	Experimentell nachgewiesen	Duh et al., 2001; Gray et al., 2002

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit; dargestellt sind die für diese Studie relevanten Zeckenarten und Pathogene

### 1.1.1. *Rhipicephalus sanguineus*

Diese Zeckenart parasitiert in erster Linie bei Hunden und gilt als sehr wirtsspezifisch, obwohl *Rh. sanguineus* (braune Hundezecke) auch andere Säugetiere aufsuchen kann (Gray et al., 2013; Levin et al., 2012). Es sind auch Berichte veröffentlicht, laut denen *Rh. sanguineus* den Menschen befällt (Fournier



et al., 2003; Omeragic, 2011). Die braune Hundezecke gilt als endophil (=befallen von Wirten in ihrer Behausung) und bevorzugt als Habitat u. a. Hundezwinger (Dantas-Torres, 2010). Sie ist damit häufig in der Nähe menschlicher Behausungen zu finden (Gray et al., 2013). Die 3-wirtige Zecke gilt als die weltweit am meisten verbreitete Zeckenart und kommt primär in subtropischen bis tropischen Regionen vor (Gray et al., 2013), wobei sich *Rh. sanguineus* gut bei Temperaturen von 20-30°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35% - 95% entwickeln kann (Dantas-Torres, 2010; Koch & Tuck, 1986). Obwohl diese Zecke auch für sie kritische Temperaturen tolerieren kann, findet eine Weiterentwicklung unter 14 °C nicht statt (Inokuma et al., 1996). Somit ist eine Etablierung dieser Zeckenart bei kontinentalem Klima nur in geschützten Räumen möglich (Gothe & Hamel, 1973).

In den Jahren 2005-2009 wurden 108 Hunde aus Tirana auf Ektoparasiten untersucht, wobei mit einer Befallsrate von 23,8% *Rh. sanguineus* die am häufigsten abgesammelte Zeckenart war (Xhaxhiu et al., 2009).

### **1.1.2. *Dermacentor reticulatus***

Die ebenfalls 3-wirtige Zeckenart *Dermacentor reticulatus* (Auwaldzecke) bevorzugt gemäßigtes Klima und ist meist in humiden Gebieten wie Auwäldern und Flusslandschaften, aber auch in trockeneren Gebieten wie Weideflächen bis zu einer Höhe von 1000 m. ü. NN zu finden (Deplazes et al., 2012; Hornok & Farkas, 2009). Dabei weist diese exophile Zeckenart (=befällt Wirte außerhalb ihrer Behausung, von der Vegetation aus) ein breites Wirtsspektrum auf, welches insbesondere aus Kleinsäugetern sowie domestizierten und wildlebenden Ungulaten (Cerviden, Pferde, Rinder, Schafe) und Karnivoren (Füchse, Hunde) besteht (Deplazes et al., 2012; Santos-Silva et al., 2011; Sobrino et al., 2012).

Das Vorkommen von *D. reticulatus* wurde bisher in Albanien nicht beschrieben, wohl aber in Serbien und Bosnien-Herzegowina (Hamel et al., 2009; Omeragic, 2011; Tomanovic et al., 2013).

### **1.1.3. *Ixodes ricinus***

*Ixodes ricinus* ist ebenfalls 3-wirtig und vorwiegend in klimatisch gemäßigten Habitaten mit hoher relativer Luftfeuchtigkeit (>75%) und einer dichten Dentrisschicht zu finden. Diese Bedingungen sind insbesondere in durch Vegetation beschatteten Gebieten wie Laub- und Mischwäldern oder Mooren gegeben. Herrscht mediterranes, trockenes Klima vor, zieht sich *I. ricinus* eher in

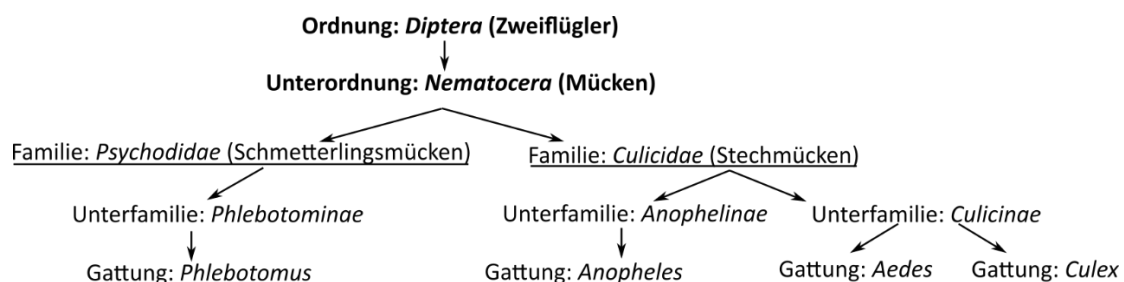
Höhenlagen bis zu 2000 m.ü.NN zurück (Deplazes et al., 2012; Medlock et al., 2013). Diese Zeckenart verhält sich exophil und befällt ihre Wirte von der Vegetation aus. Zum breiten Wirtsspektrum dieser Zecke gehören ca. 200 Wirbeltierarten (Säugetiere, Vögel und Reptilien) (Deplazes et al., 2012; Sobrino et al., 2012).

*Ixodes ricinus* war in Albaniens Hauptstadt Tirana nur bei 0,6% der dort untersuchten Hunde zu finden und war damit deutlich seltener als *Rh. sanguineus* (Xhaxhiu et al., 2009).

## 1.2. Mücken (*Nematocera*)

### 1.2.1. Sandmücken (*Phlebotominae*)

Die Weibchen einiger Sandmückenarten der Gattung *Phlebotomus* (Abb.2) sind im europäischen Raum für die Übertragung von *L. infantum* verantwortlich (Killick-Kendrick, 1999). Phlebotomen sind dort in warmen, gemäßigten und subtropischen Zonen verbreitet (ECDC,2015). Als endemische Arten in Albanien mit erwiesener Vektorkompetenz sind *P. neglectus*, *P. perfiliewi* und *P. tobbi* zu nennen (Killick-Kendrick, 1999; Léger et al., 1988; Velo et al., 2005), wobei *P. neglectus* am häufigsten detektiert wurde (Velo et al., 2005).



**Abb. 2: Vereinfachte Systematik der Gattungen *Phlebotomus*, *Anopheles*, *Aedes* und *Culex* nach Deplazes et al., 2012**

### 1.2.2. Stechmücken (*Culicidae*)

Stechmücken (*Culicidae*) unterschiedlicher Gattungen (Abb. 2) gelten als Vektoren von *D. immitis* (Cancrini & Gabrielli, 2007). Unter anderem wurden *Aedes koreicus*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* und *Anopheles maculipennis* in Italien als kompetente Vektoren identifiziert (Cancrini et al., 2003; Cancrini & Gabrielli, 2007; Cancrini et al., 2006; Montarsi et al., 2015). Bis auf *Aedes koreicus* ist das

Vorkommen dieser Arten auch in Albanien beschrieben (Adhami & Reiter, 1998). Als Vektor von *D. immitis* kommt der asiatischen Tigermücke (*Ae. albopictus*) aufgrund der nachweislich sehr effizienten Filarienübertragung und der unspezifischen Wirtswahl die größte Bedeutung zu (Adhami & Murati, 1987; Adhami & Reiter, 1998; Cancrini & Gabrielli, 2007).

## 2. Ordnung *Rickettsiales*

Bei der Ordnung *Rickettsiales* handelt es sich um gramnegative Bakterien der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria. Dieser Ordnung zugehörig ist die Familie *Rickettsiaceae* mit der für diese Studie relevanten Gattung *Rickettsia*. Arten dieser Familie sind obligat intrazellulär und vermehren sich frei im Zytoplasma eukaryotischer Wirtszellen (Dumler et al., 2001; Merhej et al., 2014). Zudem ist die der Ordnung *Rickettsiales* angehörige Familie *Anaplasmataceae* mit den Gattungen *Ehrlichia* und *Anaplasma* für die vorliegende Untersuchung relevant. Auch dieser Familie unterstellten Arten sind obligat intrazellulär, vermehren sich jedoch in intrazytoplasmatischen Vakuolen, wodurch sogenannte Morula entstehen können (Dumler et al., 2001; Rikihisa, 1991).

### 2.1. Spotted Fever Group *Rickettsiae*

#### 2.1.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Die Gattung *Rickettsia* wurde ursprünglich anhand von morphologischen, antigenetischen und metabolischen Eigenschaften in zwei Gruppen, die Zeckenbissfieber (Spotted Fever) - Gruppe (SFG) und die Fleckfieber (Typhus)-Gruppe, unterteilt. Basierend auf phylogenetischen Studien erfolgt die Unterteilung dieser Gattung heutzutage in vier Gruppen: In die Zeckenbissfieber-, die Typhus-, die *Rickettsia belli*- und die *Rickettsia canadiensis*-Gruppe. Insgesamt werden der Gattung *Rickettsia* zur Zeit 27 Spezies zugewiesen (Merhej et al., 2014). Mit Hilfe molekularer Methoden wurden in den letzten 20 Jahren einige neue Spezies beschrieben und es kann davon ausgegangen werden, dass weiterhin viele, bisher noch unbekannte Arten existieren (Parola et al., 2013).

Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrieren sich auf die Zeckenbissfiebergruppe, wobei der Schwerpunkt auf *R. conorii* liegt, da dieser Spezies in Südeuropa die größte Bedeutung zuteil wird (Oteo & Portillo, 2012). Die Art *R. conorii* wird in die Unterarten *R. conorii conorii*, *R. conorii capsia*, *R. conorii*

*israelensis* und *R. conorii indica* unterteilt, deren genetische Unterschiede aber nicht ausreichen, um als eigene Arten gewertet zu werden (Rovero et al., 2008; Zhu et al., 2005). Hunde können als Reservoir für *R. conorii* dienen (Alexandre et al., 2011; Levin et al., 2012). Hasen, kleine Nagetiere und Igel werden als mögliche Reservoir diskutiert (Parola et al., 2013; Rovero et al., 2008). Grundsätzlich ist die eigentliche Bedeutung von Säugetieren als Reservoir für Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe allerdings weitgehend ungeklärt (Parola et al., 2013). Reservoirpotential wird auch *Rh. sanguineus* unterstellt, da bei dieser Zeckenart die transovariable Übertragung von *R. conorii* spp. *conorii* nachgewiesen werden konnte (Socolovski et al., 2009).

### 2.1.2. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund

Soweit bekannt, verlaufen Infektionen mit SFG Rickettsien bei Hunden in Europa meist asymptomatisch (Allison & Little, 2013). Akute fieberhafte Verläufe bei Infektionen mit *R. conorii* werden zunehmend beschrieben (Alexandre et al., 2011; Levin et al., 2012; Solano-Gallego et al., 2006a). In Nordamerika kann *R. rickettsii* bei Hunden zum sogenannten Rocky Mountain Spotted Fever mit schweren Krankheitsverläufen führen. Das Vorkommen dieses Bakteriums ist in Europa bisher nicht nachgewiesen worden (Allison & Little, 2013; Greene & Breitschwerdt, 2006).

Mit hunderten dokumentierten Krankheitsfällen jährlich ist das von *R. conorii* verursachte Mediterranean Spotted Fever (MSF) die häufigste Rickettsiose des Menschen in Europa. *R. conorii* galt in Europa lange als einziges zeckenübertragenes Pathogen der SFG-Rickettsien (Oteo & Portillo, 2012; Parola et al., 2005; Raoult & Roux, 1997). Heute ist bekannt, dass auch andere *Rickettsia* spp. Symptome verursachen können, die denen des MSF entsprechen (Parola et al., 2013; Zhu et al., 2005). Dabei tritt häufig eine von einer Hautrötung umgebene, schwarze, krustige Läsion an der Zeckenbissstelle auf. Zu den weiteren typischen Symptomen zählen Fieber und ein makulopapulöses Exanthem, welches oft die Extremitäten betrifft (Germanakis et al., 2006; Parola et al., 2013). Meist tritt nach einigen Tagen Besserung ein (Oteo & Portillo, 2012). Es werden jedoch zunehmend schwere, atypische Krankheitsverläufe beschrieben, die tödlich enden können (de Sousa et al., 2006; Parola et al., 2013). Die beobachtete Zunahme der MSF-Erkrankungen wird unter anderem mit einer Zunahme von Zeckenstichen aufgrund des Klimawandels erklärt (Oteo & Portillo, 2012; Parola et al., 2005).

### 2.1.3. Vorkommen in Südosteuropa

Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe sind weltweit verbreitet, wobei die geographische Verbreitung nicht zuletzt abhängig ist von der Epidemiologie der jeweiligen Vektor-Zecken, welche zugleich als Reservoir gelten (Parola et al., 2013; Raoult & Roux, 1997). Tab. 2 ist zu entnehmen, welche Rickettsienarten in Südosteuropa bei Menschen und/oder Zecken nachgewiesen wurden.

**Tab. 2: Mittels PCR in Zecken oder Menschen nachgewiesene Rickettsienarten der Zeckenbissfiebergruppe in Südosteuropa<sup>1)</sup>**

<i>Rickettsia</i> spp.	Wirt	Land	Referenz	Erkrankung <sup>2)</sup>
<i>Rickettsia aeschlimanii</i>	Mensch <i>Hyalomma anatolicum excavatum</i> <i>Hyalomma marginatum</i>	Griechenland Griechenland  Kroatien	Germanakis et al., 2013 Psaroulaki et al., 2006  Punda-Polic et al., 2002 Duh et al., 2003	Zeckenbissfieber
<i>Rickettsia conorii</i>  <i>R. conorii</i> spp. <i>capsia</i>	Mensch  <i>Rhipicephalus sanguineus</i>  <i>Rhipicephalus bursa</i> <i>Hyalomma plumbeum</i> <i>Rh. sanguineus</i>	Kroatien Griechenland Griechenland Albanien Albanien Albanien Kosovo	Sardelic et al., 2003 Psaroulaki et al., 2005a Psaroulaki et al., 2003 Christova et al., 2003  Fournier et al., 2003	MSF   Astrakhan Fieber
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>   <i>Rh. sanguineus</i> <i>Rh. bursa</i> <i>Dermacentor reticulatus</i>	Serbien  Bulgarien Rumänien Albanien Albanien Kroatien	Radulovic et al., 2011 Tomanovic et al., 2013 Christova et al., 2003 Ionita et al., 2013 Christova et al., 2003	Evtl. leichtes Fieber, keine bestätigte Humanpathogenität
<i>Rickettsia massiliae</i>	<i>Rh. sanguineus</i> / <i>Rh. bursa</i> <i>Rhipicephalus turanicus</i>	Griechenland Griechenland	Psaroulaki et al., 2003 Psaroulaki et al., 2006	Zeckenbissfieber
<i>Rickettsia monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Serbien  Rumänien	Radulovic et al., 2011 Tomanovic et al., 2013 Ionita et al., 2013	Zeckenbissfieber
<i>Rickettsia ripicephali</i>	<i>Rh. sanguineus</i> / <i>Rh. bursa</i> <i>Rh. sanguineus</i> <i>Rh. turanicus</i>	Griechenland Griechenland Kroatien	Psaroulaki et al., 2003 Psaroulaki et al., 2006 Duh et al., 2003	Nicht bekannt
<i>Rickettsia slovaca</i>	<i>Rh. bursa</i> <i>Dermacentor marginatus</i>  <i>D. reticulatus</i>	Griechenland Kroatien  Rumänien Kroatien	Kachrimanidou et al., 2010 Duh et al., 2003; Punda-Polic et al., 2002 Ionita et al., 2013 Dobec et al., 2009	SENLAT
<i>Rickettsia sibirica mongolitimonae</i>	Mensch <i>Hy. anatolicum excavatum</i>	Griechenland Griechenland	Psaroulaki et al., 2005b	LAR
<i>Rickettsia raoultii</i>	<i>D. marginatus</i>	Rumänien	Ionita et al., 2013	SENLAT
<i>Rickettsia hoogstraalii</i>	<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Kroatien	Duh et al., 2010	Nicht bekannt

<sup>1)</sup> Kein Anspruch auf Vollständigkeit

<sup>2)</sup> Erkrankungen beim Menschen nach (Parola et al., 2013)

## **2.2. *Anaplasma* spp.**

### **2.2.1. Taxonomie und Wirtsspektrum**

Zu den bei Hunden relevanten Bakterienarten der Gattung *Anaplasma* zählen *A. platys*, Erreger der kaninen zyklischen Thrombozytopenie und *A. phagocytophilum*, Erreger der Caninen Granulozytären Anaplasmosen (CGA). Im Jahr 2001 wurden *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* und der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose (HGE), basierend auf Ergebnissen phylogenetischer Studien des 16S rRNA-Gens, zu einer einzigen Art zusammengefasst und zu *A. phagocytophilum* umbenannt und in die Familie der *Anaplasmataceae* eingeordnet (Dumler et al., 2001). Dieses Bakterium repliziert hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten und kann u.a. zu Erkrankungen bei Hunden, Pferden, Wiederkäuern und Menschen führen (Woldehiwet, 2010). Zudem gelten viele wildlebende Säugetierarten als Reservoirwirte; der Nachweis transovarieller Übertragung bei Zecken gelang bisher nicht (Ogden et al., 1998; Stuenkel et al., 2013). Neben Infektionen durch die Vektorzecke ist die Übertragung durch Bluttransfusion (Alhumaidan et al., 2013; Carrade et al., 2009), die Möglichkeit der intrauterinen Infektion beim Rind (Pusterla et al., 1997) und der perinatale Übertragungsweg beim Menschen beschrieben (Horowitz et al., 1998). Beim Hund wurde die transplazentare Übertragung auf Welpen bisher nicht nachgewiesen (Plier et al., 2009).

*Anaplasma platys* wurde erstmals 1978 in Florida beschrieben und zunächst als *Ehrlichia platys* klassifiziert (Harvey et al., 1978). Aufgrund von Sequenzanalysen des 16S rRNA-Gens erfolgte später die taxonomische Einordnung in die Gattung *Anaplasma* und Umbenennung in *A. platys* (Dumler et al., 2001). Lange Zeit wurden *A. platys*-Infektionen ausschließlich bei Hunden beschrieben (Dyachenko et al., 2012; Gaunt et al., 2010; Maggi et al., 2013b). In den letzten 5 Jahren wurde das Bakterium auch bei drei Menschen (Breitschwerdt et al., 2014; Maggi et al., 2013b) und einer Katze nachgewiesen (Lima et al., 2010).

### **2.2.2. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund**

#### **2.2.2.1. *Anaplasma phagocytophilum***

An CGA erkrankte Hunde zeigen nach 1-2 Wochen Inkubationszeit (Egenvall et al., 1998) in der Regel einen asymptomatischen bis milden Krankheitsverlauf, der mit Fieber, Lethargie und Inappetenz einhergehen kann. Außerdem ist das

Auftreten von Lahmheiten möglich. Zu den häufigsten Laborveränderungen zählen Lymphozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie und eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase (Egenvall et al., 2000b; Egenvall et al., 1997; Kohn et al., 2008). Obwohl auch schwerere Krankheitsverläufe beschrieben sind, scheint die Erkrankung häufig selbstlimitierend zu sein. Es sind bisher keine klinischen Fälle mit chronischem Krankheitsverlauf bekannt (Carrade et al., 2009; Eberts et al., 2011; Ravník et al., 2014).

In den USA stieg nach Einführung der Meldepflicht die Zahl der Humanen Granulozytären Anaplasiose (HGA) Fälle von 348 im Jahr 2000 auf 1761 Fälle im Jahr 2010 an, wobei sich die Zahl der Meldungen von 2009 auf 2010 verdoppelte (CDC, 2013). Obwohl in Europa viele Säugetiere hohe Infektionsraten zeigen, sind bisher nicht mehr als ca. 100 Fälle der HGA bekannt (Doudier et al., 2010; Dumler et al., 2005). Die geringen Fallzahlen sind, abgesehen von der in Europa nicht vorliegenden Meldepflicht, möglicherweise auf verschiedene genetische Varianten des Bakteriums zurückzuführen (Woldehiwet, 2010). Die Erkrankung zeigt in Europa in der Regel einen milderen Krankheitsverlauf als in den USA, mit grippeähnlichen Symptomen und guter Prognose (Blanco & Oteo, 2002; Doudier et al., 2010).

#### 2.2.2.2. *Anaplasma platys*

Bei mit *A. platys* infizierten Hunden kommt es typischerweise nach einer Inkubationszeit von 8-15 Tagen alle 1-2 Wochen zu zyklischen Parasitämie- und Thrombozytopeniephasen (Eddlestone et al., 2007; Harvey et al., 1978). Während in den USA die Erkrankung meist subklinisch verläuft, wurden bei Hunden in Europa klinische Symptome wie Fieber, Lethargie, Lymphadenopathie, Anämie und auch letale Krankheitsverläufe beobachtet. Als Ursache für diese verschiedenen Verläufe werden unterschiedlich virulente Stämme vermutet (Antognoni et al., 2014; Greig & Armstrong, 2006; Harrus et al., 1997a; Kontos et al., 1991).

Da bisher kaum *A. platys*-Infektionen bei Menschen beschrieben sind, bedarf es zur Klärung der zoonotischen Bedeutung weiterer Untersuchungen (Breitschwerdt et al., 2014).

### 2.2.2. Vorkommen in Südosteuropa

Abhängig vom Vorkommen der Vektorzecken ist *A. phagocytophilum* (Hauptvektor *I. ricinus*) in fast allen europäischen Ländern verbreitet, während sich das Vorkommen von *A. platys* (Hauptvektor *Rh. sanguineus*) auf den mediterranen Raum konzentriert (Greene & Craig, 2006; Stuen et al., 2013). In Südosteuropa wurde *A. phagocytophilum*-DNA mittels PCR bei Hunden aus Slowenien, Rumänien, Albanien und Bulgarien nachgewiesen (Hamel et al., 2012; Hamel et al., 2013; Ravnik et al., 2014; Tsachev et al., 2008b). Der direkte Nachweis von *A. platys* gelang mikroskopisch oder mittels PCR bei Hunden aus Kroatien (Dyachenko et al., 2012), Griechenland (Kontos et al., 1991), Rumänien (Andersson et al., 2013) und Albanien (Hamel et al., 2013). Studien zur Prävalenz von *Anaplasma* spp. bei Hunden aus Südosteuropa sind in Tab. 3 aufgelistet. Fälle von HGA sind bisher aus Kroatien und Griechenland bekannt (Lotric-Furlan et al., 2003; Misic-Majerus et al., 2000; Petrovec et al., 1997).

**Tab. 3: Prävalenz und Seroprävalenz von *Anaplasma* spp. bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1\*</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweismethode (Cut-off)	Positive Hunde in % (Anzahl Positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
Albanien	Straßenhunde aus Tirana	gesunde Hunde	IFAT (>1:32)	40% (12/30)	Hamel et al., 2009
			<i>Anaplasma phagocytophilum</i> -PCR	0% (0/30)	
	Privathunde aus Tirana	keine Angaben	IFAT	24,1% (145/602)	Hamel et al., 2015
			<i>A.phagocytophilum</i> -PCR	1% (6/602)	
			<i>Anaplasma platys</i> -PCR	3,3% (20/602)	
Bulgarien	Privathunde	gesunde und kranke Hunde	IFAT (≥1:200)	46,1% (77/167)	Pantchev et al., 2015
Mazedonien	Stadt- und Landhunde	keine Angaben	ELISA (Snap-Test)	8,3% (12/144)	Stefanovska et al., 2012
Rumänien	Privathunde	keine Angaben	ELISA (Snap-Test)	5,5% (63/1146)	Mircean et al., 2012
	Straßenhunde	gesunde Hunde	IFAT (≥1:40)	4,3% (4/92)	Hamel et al., 2012
			<i>A.phagocytophilum</i> -PCR	2,8% (3/109)	
Serbien	Stadthunde	gesunde Hunde	ELISA (Snap-Test)	3,4% (13/387)	Pavlovic et al., 2012a

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit



### 2.3. *Ehrlichia canis*

#### 2.3.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Von den Arten, die der Gattung *Ehrlichia* zugehörig sind, ist bei Hunden in Europa nur *E. canis* von medizinischem Interesse. In den USA können zudem *Ehrlichia ewingii* und *Ehrlichia chaffeensis* bei Hunden parasitieren. *Ehrlichia canis* vermehrt sich in den Monozyten der Hunde und führt zur sogenannten Caninen Monozytären Ehrlichiose (CME) (Dumler et al., 2001; Neer & Harrus, 2006). Hunde, aber auch Wildkaniden wie Füchse (Amyx & Huxsoll, 1973; Fishman et al., 2004), Kojoten (Ewing et al., 1964) und Wölfe (Harvey et al., 1979) gelten als Erregerreservoir, da eine transovarielle Übertragung dieses Bakteriums von einer Zeckengeneration auf die nächste nicht nachgewiesen werden konnte (Groves et al., 1975). Neben dem vektorgebundenen Übertragungsweg ist auch eine Übertragung von Hund zu Hund mittels Bluttransfusion möglich (Harrus et al., 1998).

#### 2.3.2. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund

Die CME kann in einen akuten, subklinischen und chronischen Verlauf eingeteilt werden (Neer & Harrus, 2006). Die akute Phase tritt ca. 10-14 Tage nach der Infektion auf und geht mit Fieber, Lymphadenopathie, Lethargie, Anorexie, Splenomegalie und Blutungsneigung einher. Zu häufigen Laborveränderungen zählen Thrombozytopenie, Anämie, Hyperglobulinämie, Hypoalbuminämie und erhöhte Leberenzymaktivität (de Castro et al., 2004; Frank & Breitschwerdt, 1999). Okuläre Manifestation, häufig in Form einer beidseitigen Uveitis anterior, oder neurologische Auffälligkeiten sind möglich (Harrus & Waner, 2011; Komnenou et al., 2007). Nicht oder inadäquat behandelte Hunde können persistierend infiziert in ein Monate bis Jahre dauerndes subklinisches Stadium eintreten (Neer & Harrus, 2006). Währenddessen besteht oft die einzige Laborwertveränderung in einer milden Thrombozytopenie (Harrus et al., 1998; Waner et al., 1997). Wieviel Prozent dieser Tiere letztlich eine chronische Ehrlichiose entwickeln, ist nicht bekannt. Dieses Stadium ist durch eine Knochenmarkshypoplasie und Panzytopenie geprägt und verläuft meist tödlich (Mylonakis et al., 2004; Neer & Harrus, 2006).

Obwohl *E. canis* beim Menschen kaum eine Rolle spielt, konnte bei einem venezuelanischen Strang Humanpathogenität nachgewiesen werden (Doudier et al.,

2010; Perez et al., 2006; Perez et al., 1996).

### 2.3.3. Vorkommen in Südosteuropa

*Ehrlichia canis* ist speziell in den tropischen und subtropischen Regionen Asiens, Amerikas, Afrikas und im Mittelmeerraum Europas verbreitet (Stich et al., 2008; Trotz-William & Trees, 2003). In Albanien konnte das Vorkommen von *E. canis* bereits mittels PCR im Blut von Hunden und in der Vektorzecke *Rh. sanguineus* nachgewiesen werden (Christova et al., 2003; Hamel et al., 2009). Studien über die *E. canis*-Exposition von Hunden aus Südosteuropa sind in Tab. 4 aufgeführt.

**Tab. 4: Seroprävalenz von *Ehrlichia canis* bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweismethode (Cut-off)	Positive Hunde in % (Anzahl Positive/Gesamtanzahl)	Referenz
Albanien	Straßenhunde	gesunde Hunde	IFAT (>1:40)	50% (15/30)	Hamel et al., 2009
	Privathunde	k. A.	IFAT (≥1:40)	20,8% (125/602)	Hamel et al., 2015
Bulgarien	Privathunde	kranke Hunde	IFAT (≥1:100)	37,5% (45/120)	Tsachev et al., 2006b
	Privathunde	gesunde und kranke Hunde	IFAT (≥1:100)	30% (30/100)	Tsachev et al., 2006a
	Privathunde	gesunde und kranke Hunde	EIA-Snap	21% (35/167)	Pantchev et al., 2015
Griechenland	Tierheim- und Straßenhunde	k. A.	IFAT (k.A.)	41,2% (63/153)	Jensen et al., 2003
Mazedonien	Land- und Stadthunde	k. A.	ELISA	18,7% (27/144)	Stefanovska et al., 2012
Rumänien	Privathunde	k. A.	ELISA	2,1% (24/1146)	Mircean et al., 2012
	Straßen- und Privathunde	gesunde Hunde	IFAT (≥1:40)	0,7% (1/138)	Hamel et al., 2012
Serbien	Privathunde	k. A.	IFAT (≥ 1:50)	16% (16/100)	Potkonjak et al., 2013

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit, k.A.= keine Angaben

## 3. Kanine haemotrophe Mykoplasmen

### 3.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Haemotrophe Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die sich an Erythrozyten anlagern und zu einer infektiösen Anämie bei verschiedenen Säugetieren führen können. Lange Zeit war *Mycoplasma haemocanis* die einzige beschriebene kanine Haemoplasmenart, bis 2004 *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* entdeckt wurde (Sykes et al., 2004; Sykes et al., 2005; Willi et al., 2010). Bei der Erstbeschreibung von *M. haemocanis* gaben die Eigenschaften des Bakteriums

zunächst Anlass zur taxonomischen Einordnung in die Familie *Anaplasmataceae* unter dem Namen *Haemobartonella canis* (Kikuth, 1928). Anhand von Sequenzanalysen des *16S rRNA*-Gens wurde diese Klassifizierung revidiert und es erfolgte aufgrund der molekularen Verwandtschaft und den phänotypischen Charakteristika die taxonomische Zuteilung zur Gattung der Mykoplasmen (Klasse: *Mollicutes*, Ordnung *Mycoplasmatales*, Familie: *Mycoplasmataceae*) (Messick, 2003; Messick et al., 2002; Neimark et al., 2001). Zwischen den kaninen und feline Mykoplasmen *M. haemocanis* und *Mycoplasma haemofelis* sowie *Cand. Mycoplasma haematoparvum* und *Cand. Mycoplasma haemominutum*, bestehen sehr enge genetische Verwandtschaftsverhältnisse (Birkenheuer et al., 2002; Messick et al., 2002; Sykes et al., 2004; Sykes et al., 2005).

### **3.2. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund**

Infektionen mit diesen Bakterien rufen fast ausschließlich bei immunsupprimierten oder splenektomierten Hunden klinische Symptome hervor. Betroffene Tiere können Anämie sowie Lethargie, Gewichtsverlust, Fieber und Anorexie zeigen. Selten wurden tödliche Krankheitsverläufe aufgrund einer hämolytischen Anämie beschrieben (Messick et al., 2002; Sykes et al., 2004; Willi et al., 2010). Nach überstandener akuter Phase bleiben die Tiere in der Regel chronisch infiziert (Messick, 2003; Wengi et al., 2008). Bei gesunden Hunden verläuft die Infektion im Normalfall asymptomatisch, wobei latente Infektionen mit subklinischer Anämie möglich sind (Novacco et al., 2010; Wengi et al., 2008; Willi et al., 2010).

Das zoonotische Potential der haemotrophen Mykoplasmen wurde bisher weitgehend vernachlässigt (Maggi et al., 2013a; Willi et al., 2010). Jüngst wurden aber Fälle von Infektionen mit *Cand. Mycoplasma haematoparvum* beim Menschen beschrieben (Maggi et al., 2013a; Maggi et al., 2013b).

### **3.3. Vorkommen in Südosteuropa**

Bisherige Studien zu haemotrophen Mykoplasmen lassen auf eine weltweite Verbreitung schließen (Willi et al., 2010). Allgemein wurden, im Vergleich zu Ländern wie beispielsweise der Schweiz (1,2%), höhere Prävalenzzahlen aus mediterranen Ländern veröffentlicht (bis zu 40%) (Messick, 2003; Novacco et al., 2010; Wengi et al., 2008; Willi et al., 2010). Aus Südosteuropa sind nur wenige Studien zu kaninen haemotrophen Mykoplasmen veröffentlicht (Tab. 5). In Albanien wurden zudem bei 45 von 146 untersuchten Katzen haemotrophe

Mykoplasmen festgestellt. Diese wurden als *Cand. M. haemominutum*, *M. haemofelis* und *Cand. Mycoplasma turicensis* identifiziert (Silaghi et al., 2014).

**Tab. 5: PCR-Prävalenz von haemotrophen Mykoplasmen bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Positive Hunde in % (Anzahl positive/Gesamtanzahl)		Referenz
			Mycoplasma spp.	Identifizierte Spezies	
<b>Albanien</b>	Privathunde aus Tirana	keine Angaben	8,8% (53/602)	8,8% (53/602) <i>Mycoplasma haemocanis</i> 0% (0/602) <i>Cand. Mycoplasma haematoparvum</i>	Hamel et al., 2015
<b>Griechenland</b>	Privathunde aus Zentral-mazedonien	gesunde und kranke Hunde	10,6% (15/142)	5,6% (8/142) <i>M. haemocanis</i> 4,2% (6/142) <i>Cand. M. haematoparvum</i> 0,7% (1/142) dual infiziert	Tennant et al., 2011
<b>Rumänien</b>	Straßenhunde nach D. importiert	gesunde Hunde	14,7% (16/109)	14,7% (16/ 109) <i>M. haemocanis</i> 0% (0/109) <i>Cand. M. haematoparvum</i>	Hamel et al., 2012

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit, D.= Deutschland

## 4. *Leishmania infantum*

### 4.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Die kanine Leishmaniose ist in Europa fast ausschließlich auf *Leishmania infantum* (Klasse: *Kinetoplastida*, Familie: *Trypanosomatidae*) zurückzuführen (Gramiccia, 2011; Maroli et al., 2008). Als Hauptreservoir dieser Protozoen gelten Hunde (Dantas-Torres, 2007). Zudem konnten *L. infantum*-Infektionen auch bei Katzen, Pferden, Wildkaniden und Nagern nachgewiesen werden (Gramiccia, 2011; Millan et al., 2014). In experimentellen Studien haben sich, außer bei Hunden, bisher nur Infektionen bei Katzen (Maroli et al., 2007), Ratten (*Rattus rattus*) (Pozio et al., 1985) und Hasen (*Lepus granatensis*) (Molina et al., 2012) als für kompetente Vektoren infektiös erwiesen. Diese werden daher auch als Reserviertiere in Betracht gezogen (Millan et al., 2014). Obwohl Übertragungswege ohne den Vektor Sandmücke eine geringe Rolle spielen, kann eine Übertragung auch mittels Bluttransfusion (Baneth et al., 2008; de Freitas et al., 2006), veneral (Manna et al., 2012; Naucke & Lorentz, 2012) und möglicherweise direkt von Hund zu Hund stattfinden (Duprey et al., 2006; Solano-Gallego et al., 2009).

Auch *Leishmania tropica*, Erreger der humanen kutanen Leishmaniose, gilt in Griechenland als endemisch (Ready, 2010). *Leishmania tropica*-Infektionen sind allerdings nur selten bei Hunden beschrieben und sind somit nicht Gegenstand

dieser Arbeit (Baneth, 2006b; Baneth et al., 2014).

#### **4.2. Entwicklung**

Im Vertebratenwirt vermehrt sich das obligat intrazelluläre amastigote Stadium von *L. infantum* in den Zellen des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) durch Zweiteilung und befällt neue Zellen (Deplazes et al., 2012; Handman & Bullen, 2002). Werden diese von kompetenten Vektoren bei der Blutmahlzeit aufgenommen, findet im Mitteldarm der Phlebotomen die Umwandlung in mobile extrazelluläre promastigote Formen statt, die sich wiederum durch Zweiteilung vermehren (Bates, 2007; Kamhawi, 2006). Metazyklische promastigote Formen im vorderen Verdauungstrakt der Sandmücke können schließlich bei der nächsten Blutmahlzeit auf neue Wirte übertragen werden. Unter günstigen Bedingungen dauert die Entwicklung im Vektor 1-2 Wochen (Bates, 2007).

#### **4.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund**

Bei der kaninen Leishmaniose handelt es sich um eine systemische Erkrankung mit einer Inkubationszeit von Monaten bis Jahren und einem in der Regel schleichenden, chronischen Krankheitsverlauf (Baneth, 2006b; Oliva et al., 2006; Solano-Gallego et al., 2009). Neben einem unspezifischen Krankheitsbild, welches mit generalisierter Lymphadenomegalie, Anorexie, Lethargie und Splenomegalie einhergehen kann, werden häufig Hautveränderungen beobachtet. Diese reichen von exfoliativen, ulcerativen, nodulären und pustulären Dermatitiden bis hin zu periorbitaler und generalisierter Alopezie. Nicht selten treten bei klinischen Fällen auch Augenveränderungen wie Konjunktivitis, Blepharitis, Uveitis anterior oder Keratokonjunktivitis auf. Oft sind zudem die Nieren betroffen und insbesondere im fortgeschrittenen Stadium kann eine Niereninsuffizienz zu einem letalen Krankheitsverlauf führen (Baneth et al., 2008; Ciaramella et al., 1997; Costa et al., 2003; Koutinas et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2004). In endemischen Gebieten zeigen allerdings weniger als 10% der infizierten Hunde klinische Symptome (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Bei *L. infantum* handelt es sich zudem um eine Zoonose, die bei Menschen zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung, der viszerale Leishmaniose, führen kann. In Europa gibt es jedes Jahr ca. 700 dokumentierte Neuerkrankungen beim Menschen (Dujardin et al., 2008). Eine höher liegende Dunkelziffer wird vermutet, da davon ausgegangen werden muss, dass die meisten Erkrankungen nicht erkannt oder

gemeldet werden (Desjeux, 2004). Im Jahr 2001 lag die Sterblichkeitsrate in Albanien bei 0,7 pro 10 000 Einwohner. Dies ist 20-30x höher als in anderen südeuropäischen Ländern (Gradoni & Bryceson, 1995; Velo et al., 2003). In Westeuropa sind beinahe 50% der Erkrankten Erwachsene, die meist HIV-positiv sind oder eine Immunschwäche aufweisen (Desjeux, 2001). In Albanien dagegen sind von den Betroffenen fast 80% Kinder, die jünger als 10 Jahre sind. Erwachsene dagegen erkranken kaum (Lito et al., 2002; Petrela et al., 2010; Velo et al., 2003).

#### **4.4. Vorkommen in Südosteuropa**

In Europa wird insbesondere der Mittelmeerraum als Endemiegebiet der viszerale Leishmaniose angesehen, mit Tendenz zur Ausbreitung in nördliche Gebiete (Gramiccia, 2011; Maroli et al., 2008). Als mögliche Ursachen für die steigenden Infektionsraten in Albanien nennen Velo et al. (2003) unter anderem die Anfälligkeit der Kinder aufgrund schlechten Ernährungszustandes, ein vermehrtes Vorkommen von Sandmücken und die Zunahme infizierter Hunde bzw. steigende Streunerpopulation (Valenciano et al., 1999 ; Velo et al., 2003). Im Jahr 1977 wurde in Albanien *L. infantum* erstmals bei einem Hund beschrieben (Adhami & Murati, 1977). Publierte Studien zur Prävalenz von *L. infantum* bei Hunden aus Albanien und der Balkanregion sind Tab. 6 zu entnehmen.

**Tab. 6: Prävalenz und Seroprävalenz von *Leishmania infantum* bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweis-Methode (Cut off)	Positive Hunde in % (Anzahl Positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
<b>Albanien</b>	Hunde aus Tirana und Elbasan	gesunde und kranke Hunde	ELISA	7,9% (54/684)	Cricko et al., 1999
			PCR <sup>2</sup>	15,9% (7/44)	
	Straßen- und Privathunde, Küstenregion	gesunde und kranke Hunde	IFAT (1:40)	4,6% (7/151)	Lazri et al., 2008
	Straßenhunde aus Tirana	gesunde Hunde	IFAT (1:32)	0% (0/30)	Hamel et al., 2009
			PCR <sup>2</sup>	0% (0/30)	
	Privathunde aus Südalbanien	gesunde und kranke Hunde	ELISA	10,6% (16/151)	Bizgha et al., 2013
	Privathunde aus Tirana	keine Angabe	IFAT (> 1:32)	5,1% (31/602)	Hamel et al., 2015
			PCR <sup>2</sup>	4,7% (28/602)	
<b>Bosnien-Herzegowina</b>	Straßenhunde	kranke Hunde	Mikroskopie <sup>3</sup>	45% (14/31)	Jažić et al., 1998
<b>Bulgarien</b>	Privathunde	gesunde Hunde	IFAT (1:100)	0% (0/220)	Tsachev et al., 2007
	Privathunde	gesunde und kranke Hunde	IFAT (1:50) ELISA	0% (0/167)	Pantchev et al., 2015
<b>Griechenland</b>	Wach- und Jagdhunde	gesunde Hunde	IFAT (1:80)	24,4% (299/1550)	Papadopoulou et al., 2005
	Straßen- und Tierheimhunde	keine Angabe	IFAT (keine Angabe)	13,1% (20/153)	Jensen et al., 2003
	Privathunde	gesunde Hunde	IFAT (1:200)	19,5% (511/2620)	Athanasίου et al., 2012
<b>Kosovo</b>	Straßen- und Privathunde	gesunde Hunde	IFAT (1:40)	1,7% (2/121)	Lazri et al., 2008
<b>Kroatien</b>	Privathunde	gesunde Hunde	Dot-ELISA (1:600)	15% (46/306)	Živičnjak et al., 2005
	Privathunde	gesunde Hunde	IFAT (1:80)	13,5% (10/74)	Zivcnjak et al., 2011
<b>Mazedonien</b>	Stadt- und Landhunde	keine Angabe	IFAT (1:80)	34,7 % (50/144)	Stefanovska et al., 2012
<b>Montenegro</b>	keine Angabe	keine Angabe	Mikroskopie <sup>4</sup>	1,8% (1/55)	Bordoskii & Savin, 1970
<b>Rumänien</b>	Privat- und Straßenhunde	gesunde Hunde	IFAT (1:64)	0,9% (1/109)	Hamel et al., 2012
			PCR <sup>2</sup>	0% (0/138)	
<b>Serbien</b>	Privathunde	gesunde und kranke Hunde	IFAT(1:40) ELISA	43% (7/16)	Savić et al., 2013

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit<sup>2)</sup> Verwendetes Material: Blut<sup>3)</sup>Verwendetes Material: Milz, Lymphknoten, Leber, Knochenmark<sup>4)</sup>Verwendetes Material: Knochenmark

## 5. *Dirofilaria immitis*

### 5.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Bei *D. immitis* (Familie: *Onchocercidae*, Unterfamilie: *Dirofilarinae*) handelt es sich um Nematoden der Überfamilie *Filarioidea* (Klasse: *Secernentea*) (Deplazes et al., 2012). Die Entwicklung von *D. immitis* ist an Kaniden, insbesondere Hunde, angepasst, welche somit auch als Reservoir fungieren (Simón et al., 2012). Zudem haben Füchse (*Vulpes vulpes*), Schakale (*Canis aureus*) und Wölfe (*Canis lupus*) Reservoirpotential (Kirkova et al., 2007; Magi et al., 2008; Penezic et al., 2014). Feliden und Frettchen (*Mustela putorius furo*) können als Wirt fungieren, spielen aber epidemiologisch eine untergeordnete Rolle (Penezic et al., 2014; Simón et al., 2012; Supakorndej et al., 1994).

### 5.2. Entwicklung

Als Zwischenwirte nehmen Stechmücken beim Saugakt die Mikrofilarien aus dem peripheren Blut des Vertebratenwirts auf. Deren Entwicklung über Larve 1 und 2 zur infektiösen Larve 3 in den Malphigischen Tubuli des Vektors ist temperaturabhängig und kommt bei  $< 14\text{ }^{\circ}\text{C}$  zum Erliegen, kann aber bei höheren Temperaturen wieder fortgesetzt werden. Bei  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$  ist die Entwicklung nach 11-12 Tagen, bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  nach 16-20 Tagen abgeschlossen. Die L3 wandert dann in die Mundwerkzeuge des Vektors und wird beim nächsten Stechakt übertragen (Cancrini & Gabrielli, 2007). Im Wirt entwickelt sich die L3 zur L4, welche in die Muskulatur und Subkutis wandert, bevor es zur Häutung zum präadulten Wurmstadium L5 kommt, welches in die Venengefäße eindringt und schließlich die *A. pulmonalis* und die rechte Herzkammer erreicht (Manfredi et al., 2007). Ungefähr 6-9 Monate nach der Infektion produzieren die Weibchen Mikrofilarien, die im Blutkreislauf zirkulieren (Manfredi et al., 2007).

Es besteht eine symbiotische Verbindung von *D. immitis* und intrazellulären Bakterien der Gattung *Wolbachia* (Ordnung *Rickettsiales*). Es wird vermutet, dass diese Bakterien eine maßgebliche Rolle bei der Häutung der Parasiten spielen und essentiell für die Larvenentwicklung und das Überleben adulter Würmer sind (Bandi et al., 2001; McGarry et al., 2004; Sironi et al., 1995).

### 5.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund

Die Erkrankung zeigt bei Hunden einen chronischen Verlauf und geht in der Regel



zunächst mit pulmonalen Symptomen, wie bewegungsinduziertem Husten und zunehmender Leitungsinsuffizienz einher. Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf stellt die Entwicklung eines Cor pulmonale und kongestives Rechtsherzversagen das Hauptproblem dar (Grandi et al., 2007; Polizopoulou et al., 2000; Venco, 2007). Insbesondere bei kleinen Hunden besteht die Gefahr des Vena-Cava-Syndroms. Dabei werden durch Abschwemmung der Würmer in die rechte Herzkammer, Obturationsstenosen dieser und/oder der Arterie pulmonalis verursacht. Dies führt zur mechanischen intravasalen Hämolyse, welche sich durch Hämoglobinämie und Hämoglobinurie manifestiert. Der weitere Verlauf ist meist tödlich (Atkins et al., 1988; Polizopoulou et al., 2000; Venco, 2007). Akute und schwere Verläufe sind zudem auf den Tod von Würmern und die daraus resultierenden Thromboembolien und heftigen Entzündungsprozesse zurückzuführen (Polizopoulou et al., 2000; Simón et al., 2012).

In Nordamerika wurden die bisher dokumentierten Fälle humaner pulmonaler Dirofilariose meist von *D. immitis* verursacht, während humane Dirofilariose in Europa in der Regel auf *Dirofilaria repens* zurückzuführen waren (Pampiglione et al., 2009; Simón et al., 2012; Tasic-Otasevic et al., 2015). Menschen sind Fehlwirte, somit können die Würmer zwar die Pulmonalarterie erreichen, werden dort aber in der Regel durch die Immunantwort abgefangen. Es kommt zu Knotenbildungen in der Lunge, die meist als röntgenologische Zufallsbefunde diagnostiziert werden (Simón et al., 2012). Es sind auch Fälle von subkonjunktivaler und subkutaner Dirofilariose, welche auf *D. immitis* zurückzuführen waren, beschrieben (Avellis et al., 2011; Foissac et al., 2013). Diagnostizierte Fälle humaner Dirofilariose nehmen zu. Es wird vermutet, dass das Infektionsrisiko für Menschen höher ist, als die bisher dokumentierten Fälle annehmen lassen (Simón et al., 2012).

#### **5.4. Vorkommen in Südosteuropa**

*Dirofilaria immitis* ist weltweit in tropischen und subtropischen Gebieten endemisch (Simón et al., 2012). In den letzten 10 Jahren waren in einigen südeuropäischen Ländern, wie Italien und Spanien, eine Zunahme der Seroprävalenzen in der Hundepopulation und eine Ausbreitung des Parasiten in bisher nicht endemische Gebiete zu beobachten (Morchón et al., 2012). Als Gründe werden eine durch die Klimaerwärmung schnellere Entwicklung der Larven, sowie eine längere Aktivität und weitere Ausbreitung der Vektoren genannt (Genchi et al., 2011; Morchón et al., 2012). Zudem kann das Reisen und Importieren von

Hunden in und aus endemischen Gebieten zur Verbreitung beitragen (Genchi et al., 2005). Auch das steigende wissenschaftliche Interesse wirkt sich auf die Zunahme an diagnostizierten Infektionen aus (Simón et al., 2012). In Südosteuropa lässt die bisherige Dokumentation kaum Rückschlüsse auf eine zunehmende Präsenz oder Verbreitung des Parasiten zu. Eine Zusammenfassung über den aktuellen Wissensstand zur Verbreitung in *D. immitis* in der Balkanregion liefert die Veröffentlichung von Tasic-Otasevic et al. (Tasic-Otasevic et al., 2015). Des Weiteren gibt Tab. 7 einen Überblick über die erfassten Prävalenzzahlen bei Hunden aus diesen Ländern. Zudem konnten in Serbien und Bulgarien bei Wildkarnivoren wie Schakalen, Rotfüchsen, Wölfen und Wildkatzen adulte Würmer isoliert werden (Kirkova et al., 2007; Penezic et al., 2014). Fälle humaner Dirofilariose in der Balkanregion, die auf *D. immitis* zurückzuführen sind, wurden bisher nicht mit molekularen Methoden bewiesen (Tasic-Otasevic et al., 2015).

**Tab. 7: Prävalenz von *Dirofilaria immitis* bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweis- methode	Positive Hunde in % (Anzahl positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
<b>Albanien</b>	Straßen-und Privathunde aus der Küstenregion	gesunde und kranke Hunde	ELISA	5,3% (8/151)	Lazri et al., 2008
	Straßenhunde aus Tirana	gesunde Hunde	ELISA	3% (1/30)	Hamel et al., 2009
	Hunde von 1995/1996 aus der Küstenregion	gesunde und kranke Hunde	ELISA	13,5% (35/260)	Rapti & Rehbein, 2010
	Privathunde aus Tirana	keine Angaben	ELISA	8,8% (13/602)	Hamel et al., 2015
<b>Bulgarien</b>	Hunde unterschiedlicher Herkunft	keine Angaben	Knott	7,4% (19/258)	Georgieva et al., 2001
	Hunde unterschiedlicher Herkunft	keine Angaben	Knott und ELISA	8,6% (43/487)	Kirkova et al., 2007
	Privathunde	gesunde u. kranke Hunde	EIA Snap	16,2% (27/167)	Pantchev et al., 2015
<b>Griechenland</b>	Jagdhunde aus dem Norden	Anzeichen von Schwäche	Knott	10% (5/50)	Papazahariadou et al., 1994
	Jagdhunde aus dem Norden	gesunde Hunde	Knott	0% (0/50)	Papazahariadou et al., 1994
	Straßen- und Tierheimhunde, Großraum Athen	keine Angaben	ELISA	13,1% (20/153)	Jensen et al., 2003
	Hunde aus dem Norden	keine Angaben	ELISA	17,9% (341/61)	Lefkaditis et al., 2010
	Hunde aus dem Norden	gesunde und kranke Hunde	Knott und ELISA	13% (13/100)	Diakou & Kapantaidakis, 2014
	Hunde aus dem Süden	gesunde und kranke Hunde	Knott und ELISA	1,6% (4/252)	Diakou & Kapantaidakis, 2014
<b>Kosovo</b>	Straßen- und Privathunde	gesunde und kranke Hunde	ELISA	9,1% (11/121)	Lazri et al., 2008
<b>Kroatien</b>	Jagd-,Trüffel- und Privathunde	Keine Angaben	ELISA	6,6% (13/200)	Holler et al., 2010
<b>Mazedonien</b>	Stadt- und Landhunde	keine Angaben	ELISA	15,9% (23/144)	Stefanovska et al., 2012
<b>Rumänien</b>	67 Straßen- und 8 Privathunde	keine Angaben	ELISA	28% (21/75)	Girdan et al., 2014
	Privathunde unterschiedlicher Herkunft	keine Angaben	ELISA	3,3% (38/1146)	Mircean et al., 2012
	Straßenhunde aus dem Süden	gesunde Hunde	Knott	41,3% (62/150)	Florea et al., 2014
<b>Serbien</b>	Privathunde, nachts im Freien gehalten	gesunde Hunde	Knott	7,2% (14/193)	Tasić et al., 2008
	Hunde unterschiedlicher Herkunft	keine Angaben	Knott	1,6% (2/122)	Tasic et al., 2012
	Privathunde aus Belgrad	Anzeichen von Herzversagen	Knott und ELISA	24% (69/287)	Pavlovic et al., 2014
	Straßenhunde, Großraum Belgrad	gesunde und kranke Hunde	Knott und ELISA	29,1% (32/110)	Pavlovic et al., 2014
	Privathunde aus dem Norden	gesunde und kranke Hunde	Knott	16,4% (14/128)	Kosic et al., 2014

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit

## 6. *Babesia* spp.

### 6.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Bei *Babesia* spp. handelt es sich um zeckenübertragene Protozoen der Ordnung *Piroplasmida* der Klasse *Haematozoa* (Unterstamm *Apicomplexa*), die weltweit in Erythrozyten verschiedener Säugetiere parasitieren (Deplazes et al., 2012; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Aufgrund der Erscheinung der oval-tropfenförmige Merozoiten in Erythrozyten werden die in der Regel wirtsspezifischen Babesienarten historisch in große (2,5-5,0 µm) und kleine Babesienarten (1-2,5 µm) eingeteilt (Boozer & Macintire, 2003; Chauvin et al., 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). Als bei Hunden parasitierende Arten sind in erster Linie *B. canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* (große Babesien) und *Babesia microti*-like [Umbenennung in *Babesia vulpes* nov. sp. vorgeschlagen (Baneth et al., 2015)], *Babesia gibsoni* sowie *Babesia conradae* (kleine Babesien) zu nennen (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Die Möglichkeit der transplazentaren Übertragung wurde bei *B. gibsoni*-Infektionen beobachtet (Fukumoto et al., 2005) und auch das Vorkommen vertikaler Übertragung von *B. canis* gilt als sehr wahrscheinlich (Mierzejewska et al., 2012). Transmission mittels Bluttransfusion ist möglich (Stegeman et al., 2003).

### 6.2. Entwicklung

Über den Speichel der Zecke werden die Sporozoiten während der Blutmahlzeit ca. 2-3 Tage nach dem Ansaugen auf den Hund übertragen (Schein et al., 1979). Die Sporozoiten dringen in die Erythrozyten des Wirts ein und bilden ringförmige Trophozoiten. Durch Zellteilung entstehen Merozoiten, die birnenförmig paarweise aneinander liegen. Nach Zerstörung der Blutzellen können diese neue Erythrozyten befallen, um sich dort durch Merogonie ungeschlechtlich weiter zu replizieren. Zeckenweibchen, die an infizierten Tieren saugen, nehmen schließlich die Merozoiten auf. Die geschlechtliche Vermehrung (Gamogonie) findet im Zeckendarm statt. Die dabei gebildeten Zygoten dringen in Darmepithelzellen ein, entwickeln sich zu Ookineten und gelangen in andere Körperzellen, in denen die Sporogonie stattfindet. Sporokineten infizieren nun neue Zellen. Letztlich kommt es in den Speicheldrüsen des Vektors zur Bildung von Sporozoiten, dem für den Säugetierwirt infektiösen Stadium (Chauvin et al., 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

### 6.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund

Infektionen mit *B. canis* verlaufen bei Hunden akut bis subklinisch, selten auch perakut. Betroffene Tiere zeigen Apathie, Anorexie, Fieber, Erbrechen, eine milde bis schwere hämolytische Anämie und eine milde bis schwere Thrombozytopenie. Zudem können Azotämie, Hyperbilirubinämie, Hämoglobinurie sowie eine Erhöhung der Leberenzymaktivität präsent sein. Teilweise führen DIC, hypotensiver Schock und Multiorganversagen zu schweren bis letalen Krankheitsverläufen (Ayoob et al., 2010; Mathe et al., 2007; Mathe et al., 2006; Solano-Gallego et al., 2008b; Taboada & Lobetti, 2006). Entsprechende Symptome wurden auch bei an akuter kaniner Babesiose erkrankten Hunden in Albanien beobachtet (Andoni et al., 2013; Andoni et al., 2012). Die Charakteristik des chronischen Verlaufes ist kaum dokumentiert (Ayoob et al., 2010; Taboada & Lobetti, 2006).

Hunde, die sich mit *B. vogeli* infizieren, zeigen meist einen subklinisch bis milden Krankheitsverlauf. Leichtes Fieber und milde Anämie sind möglich. Schwere Krankheitsverläufe sind bei immunkomprimierten oder splenektomierten Tieren sowie bei Welpen beschrieben (Solano-Gallego et al., 2008b). Ähnliche Krankheitsverläufe wurden bei Infektionen mit *B. gibsoni* beobachtet (Meinkoth et al., 2002; Taboada & Lobetti, 2006; Trotta et al., 2009b). Infektionen mit *B. vulpes* nov. sp. gehen oft mit einer Anämie und nicht selten mit Nierenversagen einher (Camacho et al., 2004; Camacho et al., 2001).

Bei der humanen Babesiose handelt es sich um eine weltweit verbreitete, lebensbedrohliche, zoonotische Erkrankung. In Europa wurden allerdings bisher nur vereinzelte Fälle fast ausschließlich bei immunkomprimierten Menschen beschrieben. Diese wurden auf Infektionen mit *Babesia divergens*, *B. microti* und *Babesia venatorum* zurückgeführt. *Babesia canis* oder *B. vogeli* sind beim Menschen bisher nicht sicher nachgewiesen worden (Gray et al., 2010; Hildebrandt et al., 2013; Homer et al., 2000).

### 6.4. Vorkommen in Südosteuropa

Bei Hunden spielen in Europa primär *B. canis* und *B. vogeli* eine Rolle. *Babesia canis* kommt dabei die weitaus größere Bedeutung zu (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Selten wurden im europäischen Raum *microti*-like *Babesia* (*B. vulpes* nov. sp.) und *B. gibsoni* beschrieben (Beck et al., 2009; Imre et al., 2013b; Solano-Gallego & Baneth, 2011; Trotta et al., 2009a; Zahler et al., 2000).

Fälle klinischer Babesiose bei Hunden in Albanien wurden publiziert und sowohl *B. canis* als auch *B. vogeli* sind bereits detektiert worden (Andoni et al., 2013; Andoni et al., 2012; Hamel et al., 2009). Tabelle 8 fasst die aktuell verfügbaren *Babesia* spp.-Prävalenzzahlen bei Hunden aus den Balkanländern zusammen.

**Tab. 8: Prävalenz und Seroprävalenz von *Babesia* spp. bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Klinischer Status	Methode (Cut off)	Positive Hunde in % (Anzahl positive/ Gesamtanzahl)	Identifizierte Spezies (positive Hunde in %)	Referenz
Albanien	gesunde und kranke Hunde	IFAT ( $\geq 1:40$ )	9,9 % (15/151)		Lazri et al., 2008
	gesunde Hunde	IFAT ( $> 1:32$ )	13,3 % (4/30)		Hamel et al., 2009
		Mikroskopie	0% (0/30)		
		PCR	23,3% (7/30).	<i>Babesia canis</i> (13,3%) <i>Babesia vogeli</i> (10%)	
	keine Angaben	IFAT ( $> 1:32$ )	6,6% (40/602)		Hamel et al., 2015
		PCR	0,3% (2/602)	<i>B. vogeli</i> (0,3%)	
Griechenland	Keine Angabe	Mikroskopie	2,6% (4/153)	Große Babesien	Jensen et al., 2003
Kroatien	gesunde Hunde	PCR	3,4% (29/848)	<i>B. canis</i> (2,4%) <i>Babesia gibsoni</i> (0,7%) <i>B. vogeli</i> (0,2%) <i>Babeisa vulpes nov. sp</i> (0,1%)	Beck et al., 2009
	Babesiose-Symptome	PCR	100% (81/81)	<i>B. canis</i> (69,0%) <i>B. vogeli</i> (1,3%) <i>Babesia caballi</i> (1,3%) <i>Theileria equi</i> (1,3%)	
Kosovo	gesunde und kranke Hunde	IFAT ( $\geq 1:40$ )	4,1% (5/121)		Lazri et al., 2008
Rumänien	gesunde Hunde	IFAT ( $\geq 1:32$ )	19,8 % (39/197)		Imre et al., 2013a
	Babesiose-Symptome	PCR/Mikroskopie	91,8% (45/49)	<i>B. canis</i> (71,4%) <i>B. gibsoni</i> (28,6%)	Imre et al., 2013b
	gesunde Hunde	IFAT ( $\geq 1:64$ )	13 % (18/138)		Hamel et al., 2012
		PCR	45,6% (63/138)	<i>B. canis</i> (39,1%) <i>B. vogeli</i> (2,9%) <i>B. gibsoni</i> (2,2%) <i>Babesia felis-like</i> (1,4%)	
Serbien	Babesiose-Symptome	Mikroskopie	63,6% (754/1186)		Pavlovic et al., 2012b
Slowenien	Babesiose-Symptome	PCR	5,9% (14/238)	<i>B. canis</i> (4,6%) <i>B.vogeli</i> (1,3%)	Duh et al., 2004

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit

## **7. *Hepatozoon canis***

### **7.1. Taxonomie und Wirtsspektrum**

Bei *H. canis* handelt es sich um einzellige Parasiten, die der Ordnung *Adeleida* und der Klasse *Coccidea* (Unterstamm *Apicomplexa*) zuzuordnen sind (Deplazes et al., 2012). Lange Zeit wurde die kanine Hepatozoonose ausschließlich auf *H. canis* zurückgeführt. Heutzutage ist bekannt, dass im Süden der USA auch eine zweite Hepatozoon-Art, *H. americanum*, bei Kaniden parasitiert (Baneth et al., 2003). Hauptsächlich der domestizierte Hund (*Canis canis*) fungiert als Zwischenwirt (Baneth, 2011). Jedoch konnte der Parasit auch bei anderen Karnivoren nachgewiesen werden (Baneth, 2011; Hodzic et al., 2015). Neben der vektorgebundenen Übertragung von *H. canis* sind intrauterine Infektionen möglich, während eine Ansteckung via Bluttransfusion bisher nicht nachgewiesen wurde (Baneth, 2011; Murata et al., 1993a).

### **7.2. Entwicklung**

Die ungeschlechtliche Vermehrung von *H. canis* erfolgt im Zwischenwirt Hund (ca. 28 Tage), während im Zeckenvektor die geschlechtliche Fortpflanzung (ca. 53 Tage) stattfindet (Baneth, 2011; Baneth et al., 2007). Dabei werden die meist in den neutrophilen Granulozyten des Zwischenwirtes lokalisierten *H. canis*-Gamonten von der Zecke während der Blutmahlzeit aufgenommen. Im Zeckendarm erfolgt, nach vollzogener Gamogonie, die Sporogonie des Parasiten. Infolgedessen sind Oozysten, die Hunderte von Sporozysten enthalten, in der Hämolymphe des Vektors dedektierbar (Baneth, 2011; Baneth et al., 2007). Wird nun der Vektor vom Zwischenwirt oral aufgenommen, werden Sporozoiten durch den Verdauungsprozess freigesetzt. Diese passieren die Darmwand des Zwischenwirts, gelangen in mononukleäre Zellen und werden hämatogen und/oder lymphogen zum Knochenmark, den Lymphknoten, der Milz und anderen Organen transportiert. Dort findet die Merogonie statt und schließlich kommt es in den Leukozyten zur Bildung der ellipsoiden Gamonten (Baneth, 2006a; Baneth et al., 2007).

### **7.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund**

Bei immunkompetenten Hunden verläuft die Infektion in der Regel asymptomatisch. Schwere Krankheitsverläufe sind aber möglich und durch Kortikosteroidgabe in hohen Dosen provozierbar (Baneth et al., 2001). Erkrankte Hunde werden häufig mit Lethargie, Fieber, Inappetenz und Lymphadenomegalie

vorgestellt. Bei Laboruntersuchungen können eine Anämie, Leukozytose, Neutrophilie, Eosinophilie, Hypoalbuminämie, Hyperglobulinämie sowie eine Erhöhung der CK präsent sein. Pathologisch konnten u.a. Splenitiden, Hepatitiden, Pneumonien und Glomerulonephritiden aufgrund von Meronten diagnostiziert werden. Der Schweregrad der Erkrankung korreliert mit der Parasitendichte (Baneth & Weigler, 1997; Gavazza et al., 2003; Kontos & Koutinas, 1990).

Obwohl noch nicht das gesamte Wirtsspektrum von *H. canis* evaluiert wurde, ist anzunehmen, dass für immunkompetente Menschen keine Pathogenität des Parasiten ausgeht (Baneth, 2006a).

#### 7.4. Vorkommen in Südosteuropa

*Hepatozoon canis*-Infektionen treten weltweit hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen auf, wobei im europäischen Raum primär in Gebieten mit einem mediterranen Klima ein Infektionsrisiko besteht (Baneth, 2011; Gavazza et al., 2003). Tab. 9 zeigt Prävalenzuntersuchungen zu *H. canis* bei Hunden aus Südosteuropa. Zudem waren in einer Studie aus Bosnien-Herzegowina 38,6% der 119 mittels PCR untersuchten Milzproben von Rotfüchsen *H. canis* positiv (Hodzic et al., 2015).

**Tab. 9: Prävalenz von *Hepatozoon* spp. bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweismethode	Positive Hunde in % (Anzahl positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
Albanien	Straßenhunde aus Tirana	gesunde Hunde	Mikroskopie	17% (5/30)	Hamel et al., 2009
	Straßenhunde	gesunde und kranke Hunde	PCR	52,8% (19/36)	Lazri et al., 2008
	Privathunde aus Tirana	keine Angaben	Mikroskopie	1% (6/602)	Hamel et al., 2015
Bulgarien	nicht bekannt	krank, koinfiziert mit <i>Ehrlichia canis</i>	Mikroskopie	ein Fallbericht	Tsachev et al., 2008a
Griechenland	Privathunde	Hunde mit Ehrlichiose	Mikroskopie	2,6% (2/69)	Mylonakis et al., 2005
			ELISA	65,2% (45/69)	
Kroatien	Privathunde	gesunde Hunde	PCR	11,8% (108/924)	Vojta et al., 2009
Rumänien	Straßenhunde	gesunde Hunde	PCR	3,7% (4/109)	Hamel et al., 2012

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit



## 8. *Toxoplasma gondii*

### 8.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

*Toxoplasma gondii* wurde vor mehr als 100 Jahren erstmals beschrieben und gilt bis heute als einziger Vertreter der Gattung *Toxoplasma* (Dubey, 2010). Diese obligat intrazellulären Protozoen zählen zur Klasse *Coccidea* (Unterstamm *Apikomplexa*) und werden der Ordnung *Eimeriida* zugeordnet (Deplazes et al., 2012). Obwohl sich weltweit Vögel und wahrscheinlich alle Säugetierarten mit *T. gondii* infizieren können, findet die enteroepitheliale Entwicklung mit resultierender Oozysten-Ausscheidung nur bei Feliden statt. Diese gelten somit als die einzigen Endwirte. Alle anderen Warmblütler stellen Zwischenwirte dar, welche Gewebszysten beherbergen können (Dubey, 2010; Dubey & Lappin, 2006). Kongenitale Infektion, die orale Aufnahme von Oozysten, beispielsweise durch Kontakt mit kontaminiertem Wasser, kontaminierter Nahrung oder Erde und die Ingestion von mit Bradyzoiten infiziertem Gewebe stellen die Hauptübertragungswege von *T. gondii* dar (Dubey & Lappin, 2006). Laktogene Übertragung ist möglich, spielt aber eine untergeordnete Rolle (Dubey, 2010).

### 8.2. Entwicklung

Feliden (Endwirte) infizieren sich primär durch die orale Aufnahme von infizierten Zwischenwirten. Die Entwicklung im Endwirt dauert ca. 3-10 Tage, wobei diese, wenn statt Bradyzoiten Oozysten oder Tachyzoiten aufgenommen werden, verlängert und weniger effektiv ist (Dubey, 2010). Verdauungsenzyme setzen die in Gewebszysten enthaltenen Bradyzoiten frei, die in die Epithelzellen der Dünndarmwand gelangen, wo die Merogonie erfolgt. Nach 5 ungeschlechtlichen Entwicklungsstadien kommt es zur Gamogonie. Die daraus entstehenden Zygoten werden von einer Oozystenwand ummantelt. Die Oozysten gelangen ins Darmlumen und werden mit dem Kot ausgeschieden. Nach 1-5 Tagen findet in der Umwelt die Sporogonie statt und es entstehen 2 Sporozysten mit 4 infektiösen Sporozoiten. Diese können in der Oozyste mehrere Monate auch unter widrigen Umweltbedingungen überleben (Dubey & Lappin, 2006). Nimmt ein Zwischenwirt die Oozysten oral auf, penetrieren die freigewordenen Sporozoiten die Zellen der Dünndarmwand. Es bilden sich Tachyzoiten, die sich durch Endodyogonie vermehren und hämatogen in verschiedenen Körperzellen gelangen. Mit dem Aufkommen der systemischen Immunantwort verschwinden die Tachyzoiten meist

nach ca. 3 Wochen p. i. aus dem viszeralem Gewebe. Einige enzystieren sich und es kommt zur Bildung von Gewebszysten mit tausenden sich langsam teilenden Bradyzoiten. Die Zysten befinden sich häufig in neuronalem oder muskulärem Gewebe, aber auch in anderen viszeralem Organen. Der durch die Aufnahme von in Gewebe enthaltenen Bradyzoiten induzierte Zyklus läuft vergleichbar ab. Tachyzoiten überleben meist die Magenpassage nicht und sind als Infektionsquelle weniger relevant (Dubey, 2010; Dubey & Lappin, 2006).

### **8.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund**

Symptome kaniner Toxoplasmose können respiratorischer, gastrointestinaler, neuromuskulärer sowie generalisierter Natur sein und sind mit denen der kaninen Neosporose vergleichbar (Kapitel 9). Fallzahlen kaniner Toxoplasmose gingen nach der Beschreibung von *N. caninum* 1988 deutlich zurück. Zum einen wurden diese bis dahin häufig mit Neosporoseerkrankungen verwechselt, zum anderen sind die meisten Hunde heutzutage gegen Staupe, eine virale Erkrankung, die die Entwicklung klinischer Toxoplasmose begünstigen kann, geimpft. Bei den meisten der in den letzten Jahren publizierten Fälle kaniner Toxoplasmose lagen zusätzliche Erkrankungen vor. Natürliche Fälle kongenitaler kaniner Toxoplasmose sind bisher nicht bekannt (Dubey, 2010; Dubey & Lappin, 2006).

Die Toxoplasmose ist eine Zoonose, die bei immunkompetenten Menschen meist asymptomatisch verläuft. Selbstlimitierende unspezifische Symptome wie Lustlosigkeit, Fieber, Glieder- oder Kopfschmerzen können vorkommen. Als relativ charakteristisch gilt die häufig zu beobachtende Lymphadenopathie (Dubey, 2010; McAllister, 2005). Die Entstehung einer Chorioretinitis ist möglich. Diese kann bis zu einer ein- oder beidseitigen Erblindung führen (Commodaro et al., 2009; Dubey, 2010). Die Gefahr einer schweren Erkrankung besteht für immungeschwächte Menschen, wie beispielsweise bei HIV-Infizierten. Die Reaktivierung einer latenten Infektion kann in diesen Fällen zu einer Enzephalitis und dem Tod führen. Die größte Bedeutung misst man in der Humanmedizin der kongenitalen Toxoplasmose bei. Bei Frauen, die eine Erstinfektion während der Schwangerschaft durchmachen, kann es zur Geburt von Kindern mit zerebellaren Missbildungen und/oder okulären Erkrankungen sowie zu Totgeburten kommen (Dubey, 2010; McAllister, 2005).

#### 8.4. Vorkommen in Südosteuropa

*Toxoplasma gondii*-Antikörper konnten bei Hunden und Menschen weltweit nachgewiesen werden. Die publizierten Seroprävalenzzahlen variieren dabei stark und lagen bei Hunden zwischen 5% und 88,5% und bei 4%-92% beim Menschen (Dubey, 2010; Dubey & Lappin, 2006). In südosteuropäischen Ländern reichten in den letzten 10 Jahren die Seroprävalenzen der Bevölkerung von 20% in Griechenland bis zu 49% in Albanien (Bobić et al., 2012; Diza et al., 2005; Maggi et al., 2009; Punda-Polic et al., 2000). Dabei lag in Albaniens Nachbarland Griechenland die Häufigkeit des Auftretens einer kongenitalen Toxoplasmose zwischen 2007 und 2009 bei 0,1 Fällen pro 10.000 Geburten pro Jahr (Aptouramani et al., 2012). Publierte Studien zu *T. gondii*-Seroprävalenz bei Hunden aus dieser Region sind in Tab. 10 aufgeführt. Untersuchungen zur Präsenz von *Toxoplasma*-Antikörpern bei anderen Tierarten in Südosteuropa sind von Bobić et al. 2012 zusammengefasst worden (Bobić et al., 2012). In Albanien wurde bisher, außer bei Menschen, nur eine Seroprävalenzstudie bei Katzen durchgeführt. Diese stellte *Toxoplasma*-Antikörper bei 63,2% der untersuchten Katzen fest (Silaghi et al., 2014).

**Tab. 10: Seroprävalenz von *Toxoplasma gondii* bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweismethode (Cut-off)	Positive Hunde in % (Anzahl positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
Albanien	Privathunde aus Tirana	k. A.	IFAT (≥1:50)	51,7% (311/602)	Hamel et al., 2015
Bulgarien	Straßen- und Arbeitshunde	k. A.	IFAT (>1:10)	11,2% (14/125)	Kostova et al., 1999
Griechenland	k. A.	k. A.	KBR	22,6% (169/749)	Chambouris et al., 1989

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit, k. A. = keine Angaben

### 9. *Neospora caninum*

#### 9.1. Taxonomie und Wirtsspektrum

Aufgrund großer mikroskopischer Ähnlichkeit der Tachyzoiten und Gewebszysten wurde *N. caninum* lange für *T. gondii* gehalten und erst 1988 als eigene Gattung beschrieben (Unterstamm *Apikomplexa*, Klasse *Coccidea*, Ordnung *Eimeriida*) (Deplazes et al., 2012; Dubey et al., 1988). *Neospora*-Antikörper konnten bei verschiedensten Haus- und Wildtieren nachgewiesen werden. Vitale Protozoen wurden bisher allerdings nur in Gewebe von Wiederkäuern, Hunden und Pferden

isoliert. Neosporose spielt primär bei Hunden und Rindern eine Rolle. Dabei stellt *N. caninum* weltweit einen der wichtigsten Aborterreger bei Rindern dar (Dubey & Schares, 2011). Hunde, Kojoten und Wölfe gelten als Endwirte (Dubey & Schares, 2011; Gondim et al., 2004; McAllister et al., 1998). Zu den Zwischenwirten zählen Rinder, Schafe, Ziegen und Pferde (Dubey & Lappin, 2006). Da auch Wildkaniden als Endwirte fungieren und der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) einen natürlichen Zwischenwirt darstellt, ist die Existenz eines sylvatischen Zyklus naheliegend (Rosypal & Lindsay, 2005). Wie sich Hunde unter natürlichen Bedingungen mit *N. caninum* infizieren, ist nicht hinreichend geklärt (Dubey & Schares, 2011). Vertikale Übertragung findet statt (Barber & Trees, 1998). Es wird jedoch angenommen, dass der horizontale Übertragungsweg eine größere Rolle spielt, wobei mit Gewebszysten kontaminiertes tierisches Gewebe als wahrscheinlichste Infektionsquelle gilt (Dubey & Schares, 2011).

## **9.2. Entwicklung**

Nach der oralen Aufnahme von in Gewebszysten enthaltenen Bradyzoiten, kommt es in den Darmzellen des Endwirtes Hund zur enteroepithelialen Merogonie mit anschließender Gamonten- und Zygotenbildung, woraufhin die fäkale Oozystenausscheidung erfolgt. Gleichzeitig kann es durch asexuelle Teilung auch zur Tachyzoitenbildung im Endwirt kommen, wobei der genaue Entwicklungszyklus im Hund nicht geklärt ist (Dubey et al., 2002; Dubey & Lappin, 2006). Die Oozystenausscheidung kann intermittierend über Monate persistieren, allerdings bei geringer Ausscheidungsrate (Dubey & Lappin, 2006; Dubey & Schares, 2011; Mitrea et al., 2013; Schares et al., 2005). Umwelteinflüssen gegenüber sehr resistente Oozysten (Alves Neto et al., 2011) sporulieren 1-3 Tage nach der Ausscheidung und bilden 2 Sporozysten mit je 4 Sporozoiten, die Zwischenwirte mit der Nahrung oder dem Wasser aufnehmen (Dubey et al., 2002; Dubey & Lappin, 2006). In den Darmzotten erfolgt die Umwandlung in Tachyzoiten, welche sich durch Endodyogonie vermehren und über das Blut in verschiedene Zellen wie Makrophagen, Nervenzellen, Myozyten, Endothelzellen und andere Gewebszellen gelangen. Schließlich kommt es zur Bildung von Gewebszysten mit zahlreichen Bradyzoiten, primär in neuronalem Gewebe, selten auch in Muskelzellen (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey & Schares, 2011).

### 9.3. Klinische Bedeutung bei Mensch und Hund

In der Regel verläuft eine *N. caninum*-Infektion bei Hunden subklinisch (Dubey & Lappin, 2006). Die meisten Hunde, die an kaniner Neosporose erkranken, sind Welpen, die kongenital infiziert wurden. Aszendierende Paralyse der Hintergliedmaßen, welche oft mit Muskelkontrakturen und Myositis vergesellschaftet ist, wird dabei als häufigste klinische Manifestation gesehen (Barber & Trees, 1996; Dubey & Lappin, 2006; Dubey et al., 2007). Bei älteren Hunden ist die Erkrankung oft mit Immunsuppression assoziiert und vermutlich auf Reaktivierung einer chronischen Erkrankung zurückzuführen. Diese Tiere weisen meist eine multifokale ZNS-Symptomatik auf. Darüber hinaus kann ein weites Spektrum an unspezifischen Symptomen auftreten (Dubey & Lappin, 2006; Dubey & Lindsay, 1996; Galgut et al., 2010). Im Blutbild sind eine Erhöhung der CK und AST hinweisend auf eine Neosporose (Dubey & Lappin, 2006). Bei Neosporoseverdacht sollte *T. gondii* sowohl als Differentialdiagnose als auch als Koinfektion in Betracht gezogen werden (Al-Qassab et al., 2009; Dubey & Lappin, 2006; Yildiz et al., 2009).

Bisher gilt *N. caninum* nicht als humanpathogen (Dubey & Schares, 2011; McCann et al., 2008).

### 9.4. Vorkommen in Südosteuropa

*Neospora caninum* gilt als weltweit verbreitet, mit einigen wenigen Untersuchungen aus der Balkanregion (Tab. 11) (Dubey & Schares, 2011). In Albanien wurden von 146 Katzen aus Tirana 10,3% seropositiv getestet (Silaghi et al., 2014). Die Seroprävalenz bei Milchkühen aus Griechenland und Kroatien lag bei 15,2% und 5,6% (Beck et al., 2010; Sotiraki et al., 2008).

**Tab. 11: Seroprävalenz von *Neospora caninum* bei Hunden aus Südosteuropa<sup>1)</sup>**

Land	Angaben zur Herkunft	Klinischer Status	Nachweismethode (Cut off)	Positive Hunde in % (Anzahl positive/ Gesamtanzahl)	Referenz
Albanien	Privathunde aus Tirana	keine Angaben	IFAT (keine Angabe)	18% (108/602)	Hamel et al., 2015
Rumänien	Farm-, Wach- und Straßenhunde	keine Neosporose-Symptomatik	IFAT (≥1:50)	20,2% (17/84)	Mitrete et al., 2013
Serbien	Jagd-, Farm-, und Straßenhunde, Vojvodina	keine Neosporose-Symptomatik	IFAT (≥1:50)	17,2% (17/99)	Kuruca et al., 2013

<sup>1)</sup>Kein Anspruch auf Vollständigkeit

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Hunde

Im Frühjahr 2013 wurden in Albanien von 119 Polizeihunden im Rahmen des jährlichen Gesundheitschecks 119 EDTA-Blut und 117 Serumproben entnommen, um den Gesundheitsstatus dieser Hunde auf von Vektoren übertragene Infektionen zu überprüfen. Zudem wurden mit diesen Proben weitere Untersuchungen zur Erfassung eines eventuell vorausgegangenen Kontaktes mit *Toxoplasma gondii* oder *Neospora caninum* durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Entnahme bei -20 °C tiefgefroren und zur weiteren Analyse an den Lehrstuhl für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie nach München geschickt.

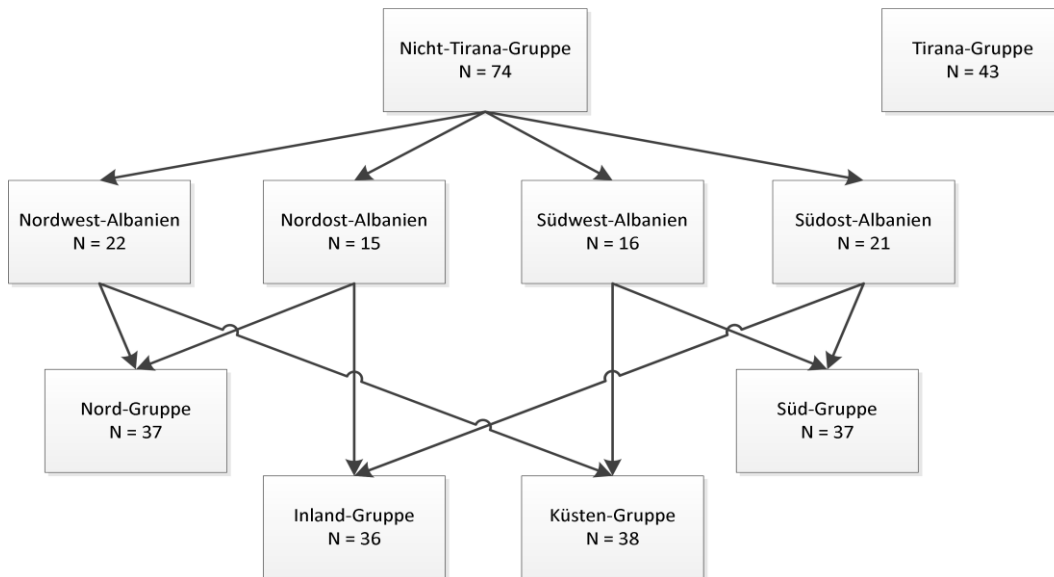
Alle Tiere wurden am Tag der Blutentnahme untersucht und als klinisch unauffällig eingestuft. Bei den beprobten Hunden handelte es sich um 116 reinrassige Deutsche Schäferhunde und 3 Labrador Retriever, von denen 32 weiblichen und 87 männlichen Geschlechts waren. Die Hunde wurden in der Regel in Zwingern gehalten und mit kommerziellem Hundefutter gefüttert. Zudem erhielten sie mindestens alle 3 Monate eine Waschung mit Neostomosan® (Wirkstoffe: Transmethrin und Tetramethrin), um einem Ektoparasitenbefall vorzubeugen. Die Ausbildung aller Hunde erfolgte bis zu einem Alter von 12-14 Monaten in der Polizeihundeschule in Tirana. Abbildung 3 zeigt, wie die Hunde in der Polizeihundeschule untergebracht waren. Das Durchschnittsalter betrug bei der Untersuchung 4,7 Jahre, wobei die Alterspanne zwischen 11 Monaten und 9 Jahre und 10 Monate lag. Um eine differenzierte Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die 117 Hunde von, denen sowohl Serum- als auch EDTA-Blutproben vorlagen, wie folgt in 3 Altersklassen eingeteilt: 36 Junghunde mit einem Alter von 0-3 Jahren, 58 adulte Tiere mit über 3 bis 7 Jahren und 23 alte Hunde, die ein Alter von über 7 bis 10 Jahren aufwiesen.



**Abb.3: Polizeihundeschule in Tirana (Foto: Enstela Shukullari)**

## **2. Geographie**

Albanien ist in 12 Qarks (Regionen, die jeweils eine Verwaltungseinheit bilden) eingeteilt. Hunde aus jedem der Qarks wurden in die Untersuchung mit eingeschlossen, nur aus Berat waren keine Proben vorhanden. In die geographische Analyse wurden die 117 Hunde eingeschlossen, von denen sowohl Serum- als aus EDTA-Blutproben vorhanden waren. Für diese Auswertung wurde das Land in 5 Gebiete eingeteilt: Dabei wurde Albanien in die 4 Regionen Nordwest-, Nordost-, Südwest- und Südostalbanien unterteilt, zudem wurde die Hauptstadt Tirana als separates Gebiet gewertet (Abb.4). Die an der Küste liegenden, dichter besiedelten Nordwest- und Südwestregionen, mit einem mediterranen Klima wurden als Küstengruppe zusammengefasst und mit den durch Berglandschaft und kontinentalem Klima geprägten östlichen Gebieten (=Inlandgruppe) verglichen. Zudem wurden die Ergebnisse der Hunde aus Südost- und Südwest-Albanien (=Südgruppe) mit denen der Hunde aus Nordost- und Nordwest-Albanien (=Nordgruppe) verglichen. Tirana nimmt als zentral gelegene Hauptstadt und Ballungsregion, in der ca. 30% der Gesamtbevölkerung Albaniens lebt, eine Sonderstellung ein. Deshalb wurden die dort lebenden Hunde als separate Gruppe erfasst und deren Untersuchungsergebnisse mit denen aller Hunde, die nicht aus Tirana stammen, verglichen (=Nicht-Tirana-Gruppe). Klimatisch gesehen ist Tirana aufgrund des dortigen mediterranen Klimas der Küstengruppe zuzuordnen. Daher wurden bei der Berechnung der logistischen Regression die Küstengruppe und die Tiranagruppe zu einer Gruppe zusammengefasst.

**Abb.4: Gruppeneinteilung der Hunde (n=117)**

### 3. Laboruntersuchungen

#### 3.1. Direkter Pathogennachweis

##### 3.1.1. DNA-Isolierung

Zur DNA-Isolierung aus EDTA-Blutproben wurde das kommerziell erhältliche QIAamp DNA MiniKit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die DNA wurde nach Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt. Dabei erfolgte die Lyse der in 200 µl EDTA-Blut enthaltenen Erythrozyten und weißen Blutzellen durch 10-minütige Inkubation mit 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer bei 56 °C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde das Gemisch abzentrifugiert, die DNA durch vortexen mit 200 µl Ethanol ausgefällt und auf QIAamp Spin Säulen pipettiert. Die Reinigung der DNA erfolgte mit jeweils 500 µl 2 verschiedener Waschpuffer, wobei nach jeder Pufferzugabe zentrifugiert wurde. Nachdem die Säule in ein steriles 1,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt wurde, wurde die DNA durch 5-minütige Inkubation in 200 µl Elutionspuffer bei Raumtemperatur gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

##### 3.1.2. Photometrische Qualitätskontrolle der DNA-Isolierung

Der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit der Extrakte wurden mittels Spectrophotometer (NanoDrop ® 1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland) kontrolliert. Die Absorption der Proben wurde bei 260 nm und 280 nm im Vergleich



zu einer Nullprobe (destilliertes Wasser) bestimmt, wobei die optische Dichte (OD) bei 260nm Aufschluss über die Konzentration der Nukleotide gab. Anhand der OD 280 wurde das Maß der Verunreinigung mit Proteinen festgestellt. Der Quotient aus OD260/OD280 sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, da sonst keine lineare Abhängigkeit der Nukleinsäurekonzentration zu der bei 280nm gemessenen Absorption besteht.

### 3.1.3. Polymerase Kettenreaktion

Der Nachweis von *L. infantum*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* und *E. canis*- DNA erfolgte mittels Real-time PCR auf dem AB-7500 FAST Real-Time (Applied Biosystems). Tabelle 12 zeigt die verwendeten Primer, TaqMan-Sonden®, Reaktionsansätze, Zyklusbedingungen und Positivkontrollen. Zudem wurde eine Negativkontrolle (molekularbiologisch reines H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland) in jeden Durchlauf integriert. Ein Ct-Wert von <39 wurde als positiv bewertet.

Der Nachweis von *B. canis*, haemotrophen Mykoplasmen und *H. canis* wurde mittels konventioneller PCR auf dem Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Details der Reaktionsansätze sind in Tabelle 13 dargestellt. PCR-Produkte der konventionellen PCR wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese dargestellt. Dabei wurde ein kleines 2% Agarosegel mit zwei 12er-Kämmen wie folgt erstellt:

1g Agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

50 ml 1 x TRIS-Acetate-EDTA-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland 50 x, verdünnt mit Aqua dest.)

5 µl GelRed® (Biotum, Hayward, USA)

Nach dem Erkalten des Gels wurden die Kämmen entfernt und 10 µl PCR-Produkt, vermischt mit 3µl Gel-loading Buffer (Thermo Fisher Scientific), in die Geltaschen pipettiert. Ein DNA-Ladder (6x Gel-loading-Puffer 100bp, Thermo-Fischer-Scientific) lief zum Größenvergleich der Gensegmente mit. Im Anschluss wurden die Genfragmente mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Geldokumenter (peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) abfotografiert. Genfragmente in Form einer Bande auf Höhe der Positivkontrolle spiegelten ein positives Ergebnis wieder.

Tab. 12: Details der durchgeführten Real-time-PCRs

Zielgen	Sonden- und Primersequenzen (5'-3')	PCR Bedingungen	Reaktionsansatz	Positiv Kontrolle	Referenz
Real-time PCR					
<i>Leishmania infantum</i>	Lsh-kp: FAM-TTTCGACAGACGCCCTACCCGC-BHQ1 Lsh-kF: CTTTCTGCTCTCCGGGTAGG Lsh-kR: CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA* <sup>1</sup>	95°C 20 sek 95°C 30 sek 60°C 30 sek 40 x	Universal fast TaqMan MMX* <sup>2</sup> Lsh-kF ( 10µM ) Lsh-kR ( 10µM ) Lsh-kp ( 10µM ) H2O molekularbiolog. rein DNA 5,0 µl	<i>L. infantum</i> DNA aus Zellkultur 1:1000 verdünnt	Mary et al., 2004
<i>Anaplasma platys</i>	EPlat-55p-S: FAM-TGGCAGACGGGTGAGTATGATAGGA-BHQ1 EPlat-19f : CGGATTTTGTGCTAGCTTGCTAT EPlat-117r: CCATTTCTAGTGGCTATCCATACTACT* <sup>1</sup>	95°C 20 sek 95°C 30 sek 60°C 30 sek 40 x	Universal fast TaqMan MMX* <sup>2</sup> EPlat-19f ( 10µM ) EPlat-117r ( 10µM ) EPlat-55p-S1 (10µM ) H2O molekularbiolog. rein DNA 5,0 µl	Genomische <i>A. platys</i> DNA von Hunde EDTA-Blut 1:10 verdünnt	Teglas et al., 2005
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ApMSP2p-FAM: TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-TAMRA ApMSP2f: ATGGAAAGTAGTGTGGTTATGGTATT ApMSP2r: TTGGTCTTGAAAGCGCTGTA* <sup>1</sup>	50°C 2 min 95°C 10 min 95°C 15 sek 60°C 1 min 40 x	TaqMan Gene Expression MMX* <sup>2</sup> ApMSP2f (10 µM) ApMSP2r (10 µM) ApMSP2p (10 µM) DNA 5,0 µl	<i>A. phagocytophilum</i> DNA aus Zellkultur 1:10000 verdünnt	Courtney et al., 2004
<i>Ehrlichia canis</i>	E.canisp30-ANYM2: FAM-CAGGATATCTTCAAAATTT-NFQ Ecanisp30-ANYF: TGGATACTACCATGGCGTTATTGG E.canisp30-ANVR: GAGGAGCATCAATTAATACTACAGGAGTT* <sup>2</sup>	50°C 2 min 95°C 10 min 95°C 15sek 60°C 1 min 40 x	TaqMan Gene Expression MMX* <sup>2</sup> Ecanis-p30ANY Assay Mix * <sup>2</sup> DNA 1,25 µl	<i>E. canis</i> Plasmid-DNA pEC-3.3 1:1000 verdünnt* <sup>1</sup>	Ionita et al., 2013

\*<sup>1</sup> Eurofins genomics, Ebersberg, Deutschland\*<sup>2</sup> Applied Biosystems Gene Expression Assay Mix, Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland

Tab. 13: Details der durchgeführten konventionellen PCRs

Zielgen	Primersequenzen (5'-3')	PCR Bedingungen	Reaktionsansatz	Positiv Kontrolle	Referenz
Konventionelle PCR					
<i>Babesia</i> spp. 18S rRNA-Gen (411-452 pb)	B11 : GTCTTGAATTGGGAATGATGG BN2: TAGTTATGGTTAGGACTACG* <sup>1</sup>	95°C 5 min 94°C 30 sek 54°C 30 sek 72°C 40. 40 x 72°C 5 min	HotStar Taq Puffer * <sup>4</sup> dNTPs ( 10 mM ) * <sup>4</sup> B11 ( 100 µM ) BN2 ( 100 µM ) HotStar Taq DNA Polymerase * <sup>4</sup> H2O molekularbiolog. rein DNA 5,0 µl 1,0 µl 0,5 µl 0,5 µl 0,25µl 37,75µl 5,0 µl	Genomische <i>B. divergens</i> DNA von Rinder EDTA- Blut 1:100 verdünnt	Casati et al., 2006
Candidatus <i>Mycoplasma</i> <i>haematoparvum</i> (202 pb) <i>Mycoplasma</i> <i>haemocanis</i> (276 pb)	OHOK1_for: ATGCCCCCTCTGTGGGGATAGCCG Cab2_for: CTGGGAACTAGAGCTCGCGAGC OOCBr1_rev: ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTCG* <sup>1</sup>	94°C 2 min 94°C 45 sek 58°C 45 sek 72°C 45 sek 35 x 72°C 5min	HotMaster Taq Buffer * <sup>3</sup> dNTPs * <sup>3</sup> OHOK1_for ( 10µM ) Cab2_for ( 10µM ) * <sup>3</sup> OOCBr1_rev ( 10µM ) HotMaster Taq Polymerase* <sup>3</sup> H2O molekularbiolog. rein DNA 5,0 µl 1,0 µl 1,0 µl 1,0 µl 0,25µl 35,75µl 5,0 µl	PEX-A- <i>Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i> 1:256.000.000 verdünnt, PEX-A- <i>Mycoplasma</i> <i>haemofelis</i> 1:2048000000 verdünnt* <sup>1</sup>	Watanabe et al., 2003
16S rRNA <i>Hepatozoon canis</i> 18S rRNA-Gen (666 pb)	Hep-F_for: ATACATGAGCAAACTCTCAAC Hep-R_rev: CTTATTATTCATGCTGCAG* <sup>1</sup>	94°C 2 min 95°C 30sek 57°C 30 sek 72°C 90 sek 34 x 72°C 5min	HotMaster Taq Puffer * <sup>3</sup> dNTPs ( 10 µM ) * <sup>3</sup> HepF_for (10 µM ) HepR_rev (10 µM ) HotMaster Taq Polymerase * <sup>3</sup> H2O molekularbiolog. rein DNA 5,0 µl 1,0 µl 1,0 µl 1,0 µl 0,25µl 36,75µl 5,0 µl	PEX-A- <i>Hepatozoon</i> <i>canis</i> 1:128.000.000 verdünnt* <sup>1</sup>	Inokuma et al., 2002

\*<sup>1</sup> Eurofins genomics, Ebersberg, Deutschland\*<sup>2</sup> Applied Biosystems Gene Expression Assay Mix, Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland\*<sup>3</sup> 5Prime, Hamburg, Deutschland\*<sup>4</sup> Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.1.4. ELISA

Der direkte Nachweis von *D. immitis*-Antigen erfolgte mittels ELISA. Da eine der Serumproben nicht mehr genug Material enthielt, wurden nur 116 Proben untersucht. Ein kommerzielles Testkit (DIROCHEK® canine Heartworm Antigen Test Kit, Synbiotics Corp., San Diego, USA), inklusive Positiv- und Negativkontrolle, kam nach Herstellerangaben zum Nachweis zirkulierender Antigene fertiler weiblicher *D. immitis*-Würmer zum Einsatz. Im ELISA-Reader (LEDetect 96, Deelux Labortechnik, Gödensdorf) wurden die Ergebnisse bei 450nm mit dem Programm MikroWin 2010 abgelesen und ausgewertet. Dieses errechnete, nach Abzug der Extinktion der Negativkontrolle von den Extinktionen der anderen Proben, einen Quotienten aus der optischen Dichte der Positivkontrolle und der der anderen Seren. Dieser Quotient gab die Reaktivität der zu untersuchenden Proben wieder. Dabei wurden Quotienten von 0-7% als negativ, 7-15% als grenzwertig und > 15% als positiv gewertet. Bei grenzwertigen Ergebnissen wurden die entsprechenden Proben ein zweites Mal untersucht.

## 3.2. Indirekter Pathogennachweis

### 3.2.1. IFAT

Der serologische Nachweis von *R. conorii*, *A. phagocytophilum*-, *E. canis*-, *L. infantum*-, *B. canis*-, *T. gondii*- und *N. caninum*-IgG -Antikörpern wurde mittels Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) erbracht. Dafür kamen kommerzielle Testkits mit antigenbeschichteten Objektträgern zum Einsatz (Tab. 14). Laut Hersteller lagen die entsprechenden Antigene in folgender Form vor:

- mit *R. conorii* infizierte Zellen
- kanine Makrophagen mit intrazellulären *E. canis* Morulae
- equine neutrophile Zellen mit intrazellulären *A. phagocytophilum* Morulae
- kanine Erythrozyten mit intrazellulären *B. canis* Merozoiten
- *Toxoplasma* Tachyzoiten
- *Neospora* Tachyzoiten

Für die Erfassung von *L. infantum*-Antikörpern fanden hauseigene, beschichtete Objektträger Anwendung. Dabei dienten aus Zellkulturen gewonnene *L. infantum*-

Promastigote als Antigene (Chang & Fish, 1983).

Zunächst erfolgte ein Screening der Proben mit den Verdünnungsstufen 1:64 (*R. conorii*), 1:40 (*E. canis*), 1:32 (*L. infantum*, *B. canis*), 1:50 (*T. gondii*, *N. caninum*, *A. phagocytophilum*). Zudem wurde pro Durchgang je eine Positiv- und eine Negativkontrolle verwendet (Tab. 14). Inkubation und Waschungen erfolgten nach Herstellerangaben. Dabei entstanden, wenn die jeweiligen Antikörper vorhanden waren, Antigen-Antikörperbindungen, während nichtgebundene Proteine abgespült wurden. Um die Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen, wurde auf jedes Feld FITC-konjugierte Anti-Hund IgG-Antikörper (F-7884, Sigma Deisenhofen) aufgetragen, welche zuvor zur Gegenfärbung 20-fach mit 0,03% Evans Blau vermennt worden waren. Nach einer weiteren Inkubation in der feuchten Wärmekammer wurden die Objektträger wieder mit PBS-Puffer (Tab.15) gewaschen und 2 x 5 Minuten in Küvetten mit destilliertem Wasser gestellt. Die Objektträger konnten nun mit Eindeckmittel (MegaScreen Flouvet, MegaCor) beschichtet und bei 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

Als positiv gewertete Proben zeigten bei den in Tab. 14 aufgelisteten Titerstufen eine entsprechende Fluoreszenz, die mit der jeweiligen Positivkontrolle verglichen wurde. Fluoreszenz, die nur bei darunterliegenden Titerstufen nachweisbar war, oder nicht fluoreszierende Sera, die durch die Rotfärbung des Evans Blau geprägt waren, wurden als negativ eingestuft. Eine grenzwertige Befundung wurde einmalig wiederholt. Im Screening als positiv gewertete Proben wurden bis zu einer Verdünnung von 1:1024 (*R. conorii*), 1:640 (*E. canis*), 1:512 (*L. infantum*, *B. canis*) und 1:800 (*T. gondii*, *N. caninum*, *A. phagocytophilum*) austitriert.

**Tab. 14: Angewandte Testkits, Positivkontrollen und Bedingungen positiver Befundbewertung bei den durchgeführten IFAT Untersuchungen**

Pathogene (Testkit)	Positiv-kontrolle	Positive Befundbewertung wenn:	
		Positive Fluoreszenzreaktion:	Titer
<i>Rickettsia conorii</i> (MegaScreen® FLUORICKETTSIA con.) <sup>*1</sup>	In Testkit enthalten	Gleichmäßig grüngelb leuchtende, zahlreiche intrazelluläre Kokken	≥ 1:64
<i>Ehrlichia canis</i> (MegaScreen® FLUOEHRlichia c.) <sup>*1</sup>	Hauseigen, Titer:1:1024	Gleichmäßig grüngelb leuchtende intrazelluläre Einschlusskörperchen (Morulae)	≥ 1:40
<i>Anaplasma</i> spp. (MegaScreen® FLUOANAPLASMA ph.) <sup>*1</sup>	Hauseigen, Titer:>1:800	Gleichmäßig grüngelb leuchtende intrazelluläre Einschlusskörperchen (Morulae)	≥ 1:50
<i>Leishmania infantum</i> (hauseigen beschichtete Objektträger)	Hauseigen, Titer: 1: 1280	Deutliche, grüngelbe Fluoreszenz der Leishmanienmembran und/oder der Geißel	≥ 1:64
<i>Babesia canis</i> (MegaScreen® FLUOBABESIA c.) <sup>*1</sup>	Hauseigen, Titer:1:2048	Gleichmäßig grüngelb leuchtende intrazelluläre oder (selten bei zerstörten Erythrozyten) extrazelluläre Merozoiten	≥ 1:64
<i>Toxoplasma gondii</i> (MegaScreen® FLUOTOXOPLASMA g.) <sup>*1</sup>	In Testkit enthalten	Deutliche, gleichmäßig grüngefärbte Fluoreszenz der gesamten Tachyzoiten-Membran	≥ 1:100
<i>Neospora caninum</i> (MegaScreen® FLUONEOSPORA c.) <sup>*1</sup>	In Testkit enthalten	Deutliche, gleichmäßig grüngefärbte Fluoreszenz der gesamten Tachyzoiten-Membran	≥ 1:100

<sup>\*1</sup> (MegaCor, Hörbranz, Austria)

**Tab.15: Herstellung von PBS Puffer (phosphate buffered saline), pH=7,4**

Stammlösung	171,25 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O + 389,25g NaCl +19,5g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 2500ml Aqua dest.
Gebrauchslösung	500 ml Stammlösung + 9500 ml Aqua dest. mit HCL und NaOH auf pH 7,4 einstellen

### 3.2.2. ELISA

Um Antikörper gegen Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe in den Seren nachzuweisen, wurde das kommerzielle Canine Spotted Fever *Rickettsia* EIA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories, Fullerton, USA) und die darin enthaltenen, mit gruppenspezifischem Lipopolysaccharid-Antigen (rLPS) beschichteten Mikrotiterstreifen verwendet. Nur 116 Seren wurden mit dieser Methode analysiert, da eine Probe aufgebraucht war. Das Antigen wurde von *R. rickettsii* gewonnen, welches, laut Herstellerangaben, serologisch mit Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe wie *R. conorii*, *R. slovaca* und *R. africae* kreuzreagiert, während keine Kreuzreaktionen mit der Typhusgruppe bekannt sind. Eine Positivkontrolle

mit positivem, ein Cut-off-Kalibrator mit schwach positivem und eine Negativkontrolle mit nicht reaktivem Hundeserum waren im Kit mit inbegriffen und wurden in jeden Durchlauf integriert. Inkubation, Waschungen, Enzym- und Substratzugabe erfolgten wie vom Hersteller vorgegeben. Die Ablesung der Absorption bei 450nm und die Ergebnisinterpretation erfolgten mittels ELISA-Reader (LEDetect 96, Deelux Labortechnik, Gödensdorf). Bei Proben mit grenzwertigen Ergebnissen wurde die Untersuchung einmalig wiederholt.

#### 4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Computerprogrammen IBM SPSS Version 22.0 und Bias für Windows Version 10.04. Eine Serumprobe enthielt nicht genug Material für die Untersuchung auf SFG Rickettsien (ELISA), eine andere zu wenig um auf *D. immitis* untersucht zu werden. Somit wurden in Berechnungen, die diese Pathogene betrafen, 116 Blutproben miteinbezogen. Für Berechnungen, die unabhängig von diesen beiden Pathogenen durchgeführt wurden, standen 117 Blutproben zur Verfügung. Mit allen der in dieser Studie eingesetzten Methoden konnten 115 Proben untersucht werden. Die Anzahl der Hunde, die Antikörper gegen zwei oder mehrere von vektorübertragenen Pathogenen aufwiesen wurden tabellarisch aufgelistet. Da es sich bei *R. conorii* auch um Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe handelt, wurden bei dieser Auflistung Tiere, die entweder *R. conorii*-IFAT- oder SFG-*Rickettsia*-ELISA- positiv waren als seropositiv auf SFG-Rickettsien eingestuft. Der Hund, dessen Serumprobe nicht mehr genügte um mit dem SFG-*Rickettsia*-ELISA untersucht zu werden, war *R. conorii* seropositiv und wurde somit in diese Auflistung miteinbezogen. Bei der nachfolgend beschriebenen statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse des SFG-*Rickettsia*-ELISAs und des *R. conorii*-IFATs getrennt voneinander betrachtet.

Nach der Methode von Clopper und Pearson wurden die exakten Konfidenzintervalle (KI 95%) für die Prävalenz der Pathogene berechnet. Als Effektgröße kam der Cramer's V zum Einsatz, um einerseits die Stärke des Zusammenhangs zwischen seropositiv befundenen Tieren und deren Herkunft, deren Geschlecht oder deren Alter zu bestimmen. Andererseits um die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Pathogenen, auf die mit serologischen Methoden untersucht wurde, zu beurteilen. Dabei wurden zum einen die von Vektoren übertragenen Pathogene und zum anderen die Protozoen *L.infantum*, *N.caninum*

und *T. gondii* paarweise miteinander verglichen. Es wurden Werte von 0 < bis 0,1 als sehr geringer, von 0,1 bis unter 0,2 als schwacher, von 0,2 bis unter 0,4 als mittlerer, von 0,4 bis unter 0,6 als relativ starker und von  $\geq 0,6$  als starker Zusammenhang interpretiert (Rea & Parker, 2005). Mittels Fisher's-exact-Test wurden die oben genannten Zusammenhänge zudem auf statistische Signifikanz überprüft. Bei der Auswertung der drei Altersgruppen wurden diese zum einen paarweise verglichen, zum anderen wurde anhand einer 2x3 Kontingenztafel der Freeman-Halton-Test, eine Erweiterung des Fisher's-exact-Tests, durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von  $p < 0,05$  angesehen. Kamen bei der geographischen Verteilung seropositiver Hunde statistisch relevante Unterschiede zutage, wurde zudem der Odds Ratio (OR) berechnet, um das Verhältnis des Expositionsrisikos genauer zu evaluieren.

Durch die multiple logistische Regressionsanalyse wurde, unter Einbeziehung der Altersgruppe, des Geschlechts und der geographischen Herkunft, der jeweilige Effekt dieser Faktoren auf die Antikörper-bzw. Antigenpräsenz der untersuchten Pathogene bestimmt. Als Maß für die Stärke des Effekts eines Faktors wurde der Odds Ratio berechnet. Der Effekt wurde als statistisch signifikant eingestuft, wenn der Wert 1,0 außerhalb des 95% Konfidenzintervalls lag (Sieber, 2008). Um in die Berechnung der multiplen logistischen Regression alle Hunde mit einbeziehen zu können, war die geographische Gruppeneinteilung, wie sie für die univariante Analyse vorgesehen war, nicht geeignet. Da die klimatischen Bedingungen in Tirana denen der Küstenregion gleichen, wurden die Hunde aus der Hauptstadt der Küstenregion zugeordnet. Aufgrund der zentralen Lage Tiranas ist die Hauptstadt weder eindeutig dem Süden noch dem Norden des Landes zuzuordnen. Daher wurden beim Nord-Südvergleich die Tiranahunde als eigene Gruppe belassen.



## **IV.     ERGEBNISSE**

### **1. Publikation**

Die Ergebnisse dieser Studie hinsichtlich der gefundenen Seroprävalenzen und der statistischen Auswertung mittels Fisher's-exact Test wurden in einer englischsprachigen Publikation veröffentlicht.

---

**Police dogs from Albania as indicators of exposure risk to *Toxoplasma gondii*,  
*Neospora caninum* and vector-borne pathogens of zoonotic and veterinary  
concern.**

Carina Schüle<sup>a</sup>, Steffen Rehbein<sup>b</sup>, Enstela Shukullari<sup>c</sup>, Dhimiter Rapti<sup>c</sup>, Sven  
Reese<sup>d</sup>, Cornelia Silaghi<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Chair of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Faculty of Veterinary  
Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Leopoldstr. 5, 80802 München,  
Germany

<sup>b</sup>Merial GmbH, Kathrinenhof Research Center, Walchenseestr. 8-12, 83101 Rohrdorf-  
Lauterbach,  
Germany

<sup>c</sup>Universiteti Bujqësor, Fakulteti i Mjeksisë Veterinare, Kodër Kamëz, SH1, Tirana 1000,  
Albania

<sup>d</sup>Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine,  
Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany

<sup>e</sup>present address: Institute of Parasitology, National Centre for Vector Entomology,  
Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Winterthurerstrasse 266a, 8057 Zürich,  
Switzerland

---

Journal: Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

Eingereicht: 15.12.2015

Akzeptiert: 18.03.2016

**Police dogs from Albania as indicators of exposure risk to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and vector-borne pathogens of zoonotic and veterinary concern.**

Carina Schüle<sup>a</sup>, Steffen Rehbein<sup>b</sup>, Enstela Shukullari<sup>c</sup>, Dhimiter Rapti<sup>c</sup>, Sven Reese<sup>d</sup>, Cornelia Silaghi<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Chair of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Leopoldstr. 5, 80802 München, Germany

<sup>b</sup>Merial GmbH, Kathrinenhof Research Center, Walchenseestr. 8-12, 83101 Rohrdorf-Lauterbach, Germany

<sup>c</sup>Universiteti Bujqësor, Fakulteti i Mjëksisë Veterinare, Kodër Kamëz, SH1, Tirana 1000, Albania

<sup>d</sup>Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München, Germany

<sup>e</sup>present address: Institute of Parasitology, National Centre for Vector Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Winterthurerstrasse 266a, 8057 Zürich, Switzerland

Corresponding author:

PD Dr. Cornelia Silaghi

Institute of Parasitology, National Centre for Vector Entomology, Vetsuisse Faculty, University of Zürich, Winterthurerstrasse 266a, 8057 Zürich, Switzerland

Tel.: ++41 44 635 87 01

Email: [cornelia.silaghi@uzh.ch](mailto:cornelia.silaghi@uzh.ch)

Email addresses:

Carina Schüle: [carina.schuele@gmx.de](mailto:carina.schuele@gmx.de)

PD Dr. Steffen Rehbein : [Steffen.Rehbein@Merial.com](mailto:Steffen.Rehbein@Merial.com)

Enstela Shukullari: [enstelashukullari@gmail.com](mailto:enstelashukullari@gmail.com)

Prof. As. Dhimiter Rapti: [dhimiterrapti@yahoo.com](mailto:dhimiterrapti@yahoo.com)

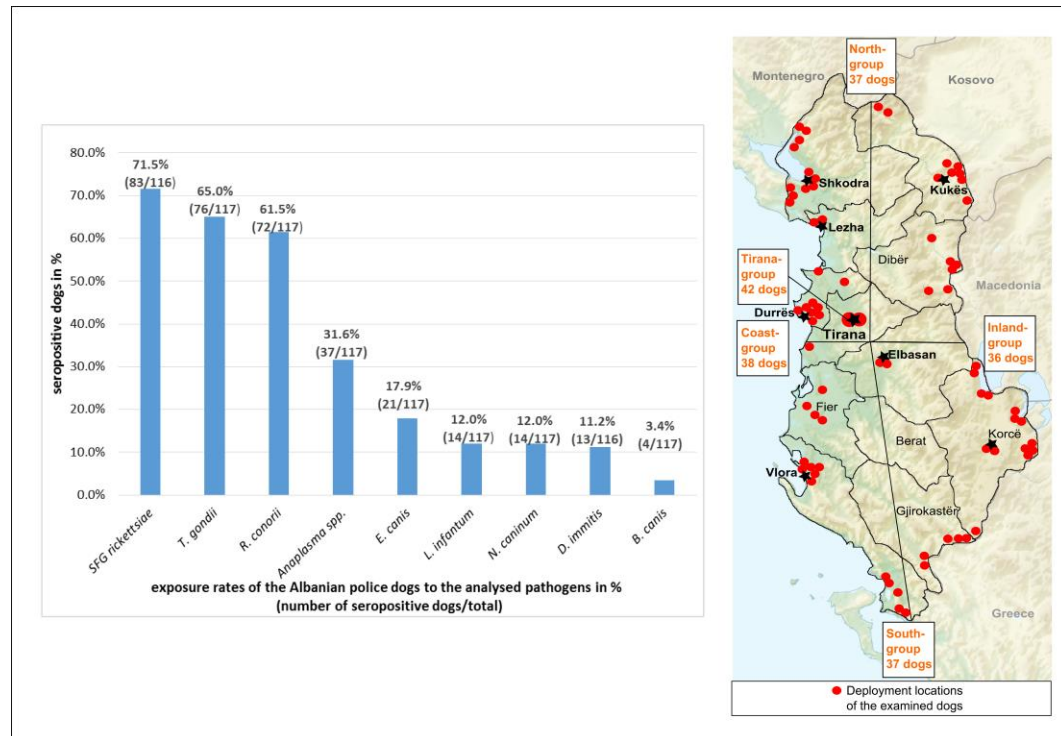
PD Dr. Sven Reese: [sven.reese@lmu.de](mailto:sven.reese@lmu.de)

## Abstract

Knowledge on the prevalence of the zoonotic and animal pathogens in dogs from Albania is thus far limited. Samples were collected from 119 police dogs which were deployed throughout Albania and which were living in close relationship with humans. Direct and/or indirect methods were used to examine 119 whole blood and 117 serum samples for the protozoans *Toxoplasma gondii* (IFAT) and *Neospora caninum* (IFAT), various vector-borne pathogens of zoonotic and veterinary concern (SFG rickettsiae [ELISA, IFAT], *Anaplasma* spp. [PCR, IFAT], *Ehrlichia canis* [PCR, IFAT], *Babesia* spp. [PCR, IFAT], *Leishmania infantum* [PCR, IFAT], *Hepatozoon canis* [PCR], *Dirofilaria immitis* [ELISA]), and haemotropic mycoplasmas [PCR]. DNA of *L. infantum* and *Anaplasma platys* was detected in the blood of four and two dogs, respectively, but all samples were negative for DNA of *E. canis*, *Babesia* spp., *H. canis* and haemotropic mycoplasmas. *D. immitis* antigen was detected in 11.2% of the serum samples. The overall seroprevalences were: SFG rickettsiae (ELISA), 71.5%; *Rickettsia conorii* (IFAT), 61.5%; *T. gondii*, 65.0 %; *Anaplasma* spp., 31.6%; *E. canis*, 17.9%; *L. infantum*, 12.0%; *N. caninum*, 12.0% and *Babesia canis*, 3.4%. Seven dogs were PCR-negative and seronegative for all tested pathogens. Significantly more dogs from South Albania (24.3%) had antigen of *D. immitis* than dogs from North Albania (5.4%,  $p=0.046$ ). There was no difference in the geographical distribution of exposure to any other pathogen. Age was found to be a risk factor ( $p<0.05$ ) for exposure to *T. gondii*, SFG rickettsiae, *Anaplasma* spp. and *L. infantum*. Co-exposure to up to five vector-borne pathogens was found in 51.5% of the 103 dogs that were seropositive for at least one vector-borne pathogen. Results of this study indicate a considerable risk of infection for dogs and/or humans with *T. gondii* and *N. caninum* and a range of zoonotic vector-borne bacterial and protozoan pathogens.

## Graphical Abstract

This work revealed exposure rates to vector-borne pathogens, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* from 3.4% up to 71.5% police dogs from different parts of Albania. *T. gondii*, *Anaplasma* spp, SFG rickettsiae, *Rickettsia conorii*, *Dirofilaria immitis* and *Leishmania infantum* are zoonotic pathogens; therefore police dogs may be considered as sentinels for the risk of pathogen exposure of their handlers' as well as indicators for the presence of pathogens in their environment.



## Highlights

Considerable exposure rates to zoonotic pathogens were found in Albanian police dogs.

The data of the police dogs also reflects an exposure risk for humans.

Age was found to be a risk factor for exposure to *T. gondii*, SFG rickettsiae, *Anaplasma* spp. and *L. infantum*.

Significantly more dogs from South-Albania were positive for *Dirofilaria immitis*.

Nearly every second dog was seropositive to two vector-borne pathogens or more.

**Keywords:** SFG rickettsiae, *Anaplasma* spp., *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*

## 1. Introduction

Vector-borne infections are of growing concern for human and canine health worldwide. Climate and environmental changes affecting the occurrence and abundance of vectors as well as travelling with dogs and their translocation from endemic regions into non-endemic regions are discussed as possible reasons (Beugnet & Marié, 2009). In the year 2011, Albania was recommended as one of the top travel destination worldwide by the 'lonely planet', so an increase of travel and tourism in the region can be expected over the coming years (lonelyplanet, 2011). Baseline data on the presence of and/or exposure to vector-borne pathogens in dogs from the whole country should be very helpful to monitor trends in the occurrence of vector-borne infections and thus estimate infection risks not only to travellers, pet-owners and veterinarians, but also to dogs and other animals (Beugnet & Marié, 2009). Until 2008, data regarding the occurrence of vector-borne pathogens other than *Babesia canis* and *Leishmania infantum* in dogs from Albania was lacking. Thereafter, the occurrence in dogs from Tirana and coastal areas of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp., *Hepatozoon canis* and *Dirofilaria immitis* was reported (Lazri et al., 2008, Hamel et al., 2009, Rapti & Rehbein, 2010). The occurrence of several vector-borne pathogens as well as *Mycoplasma haemocanis* and antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in the blood of client-owned dogs under veterinary care from Tirana was reported recently only (Hamel et al., 2016). Most vectors of these pathogens benefit from the typical Mediterranean climate of the coastal lowland of Albania facing the Adriatic and Ionian Seas. However, 70% of the territory of Albania is mountainous with continental climate and dogs from these areas have not been included in the aforementioned studies. *Leishmania infantum*, *D. immitis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia conorii* are of zoonotic concern and asymptomatic dogs could provide suitable reservoirs for these pathogens (Otranto et al., 2009, Levin et al., 2012). Police dogs often operate in public places; they have contact with many people and are often kept in densely populated areas. Due to their close relationship to humans, these dogs may therefore also be used as sentinel animals for potential zoonotic infections. As working dogs are an essential factor of police work, these animals generally receive appropriate veterinary care. The assessment of the prevalence of vector-borne and other parasitic pathogens in these dogs was considered appropriate to verify, and if indicated, to change practiced prevention

measures. The aim of this study was to evaluate the percentage-prevalence of infection and/or seroprevalence of *T. gondii*, *N. caninum*, haemotropic mycoplasmas and various vector-borne pathogens in police dogs from Albania with attention to the occurrence of co-infections and co-exposure as well as the potential association to the geographic location of the dogs in the country.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals**

All dogs included in this study (n=119) were trained in the police school of Tirana until they were 12-14 months old. Then they were deployed to police stations throughout the country or they remained in Tirana. Of the dogs examined, 116 were pure bred German shepherds and 3 were Labrador retrievers; 87 males and 32 females. The dogs had an average age of 4.7 years. All dogs were treated routinely with Neostomosan® (transmethrin plus tetramethrin) washings at least every three months. They were considered clinically healthy at the time of blood sampling. The dogs sampled were deployed in the capital Tirana and all but one (Berat) of the 12 counties of Albania. A total of 119 EDTA-blood and 117 serum samples were collected from the animals at their annual health check in the spring of 2013. The samples were frozen at -20°C until analysed. The 117 dogs, for which both EDTA-blood and serum were available were stratified for data analysis into three age-groups: young dogs (10 months-3 years; n=36), adult dogs (>3-7 years; n=58) and old dogs (>7-10 years; n=23). For the geographical analysis these dogs were grouped as follows: dogs deployed in the city of Tirana (T, n=43) and dogs that were deployed in the counties, none-Tirana (NT, n=74). None-Tirana dogs were sub-grouped to areas: dogs deployed in south Albania (S, n=37) and north Albania (N, n=37), or dogs deployed in the coastal parts (C, n=38 dogs) and in the interior (I, n=36) (Fig. 1 and 2). The age distribution of the dogs in each of the groups was similar (median age ranged from 4.3 to 4.9 years).

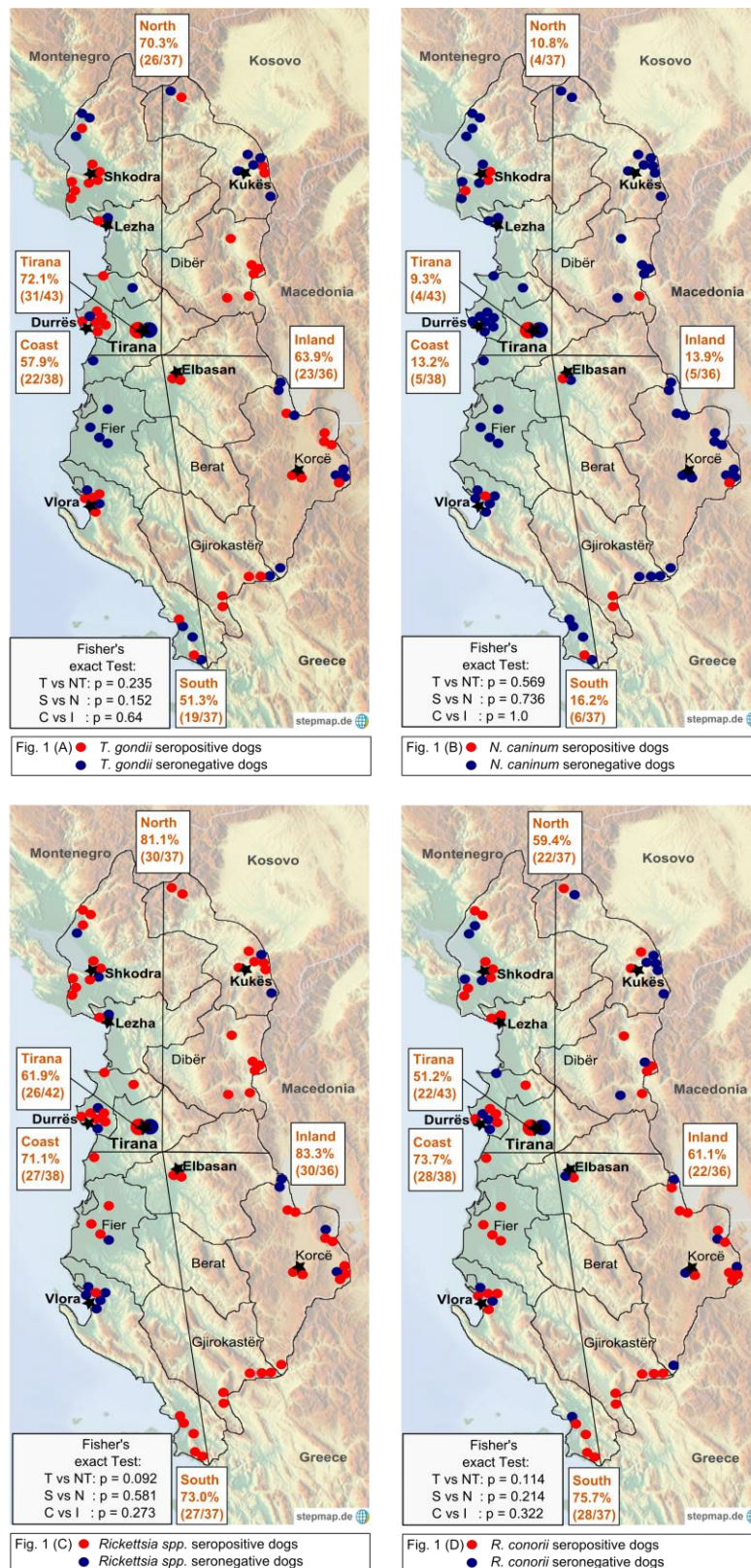


Fig. 1: Geographic distribution in Albania of the police dogs tested for antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, SFG rickettsiae and *Rickettsia conorii*.

Black lines divide non-Tirana (NT) Albania into areas - south Albania (S) + north Albania (N) or coastal Albania (C) + interior (I) - while dogs based in the city of Tirana (T) form a separate group. Prevalence of exposure was analysed as follows: T vs. NT, S vs. N and C vs. I.



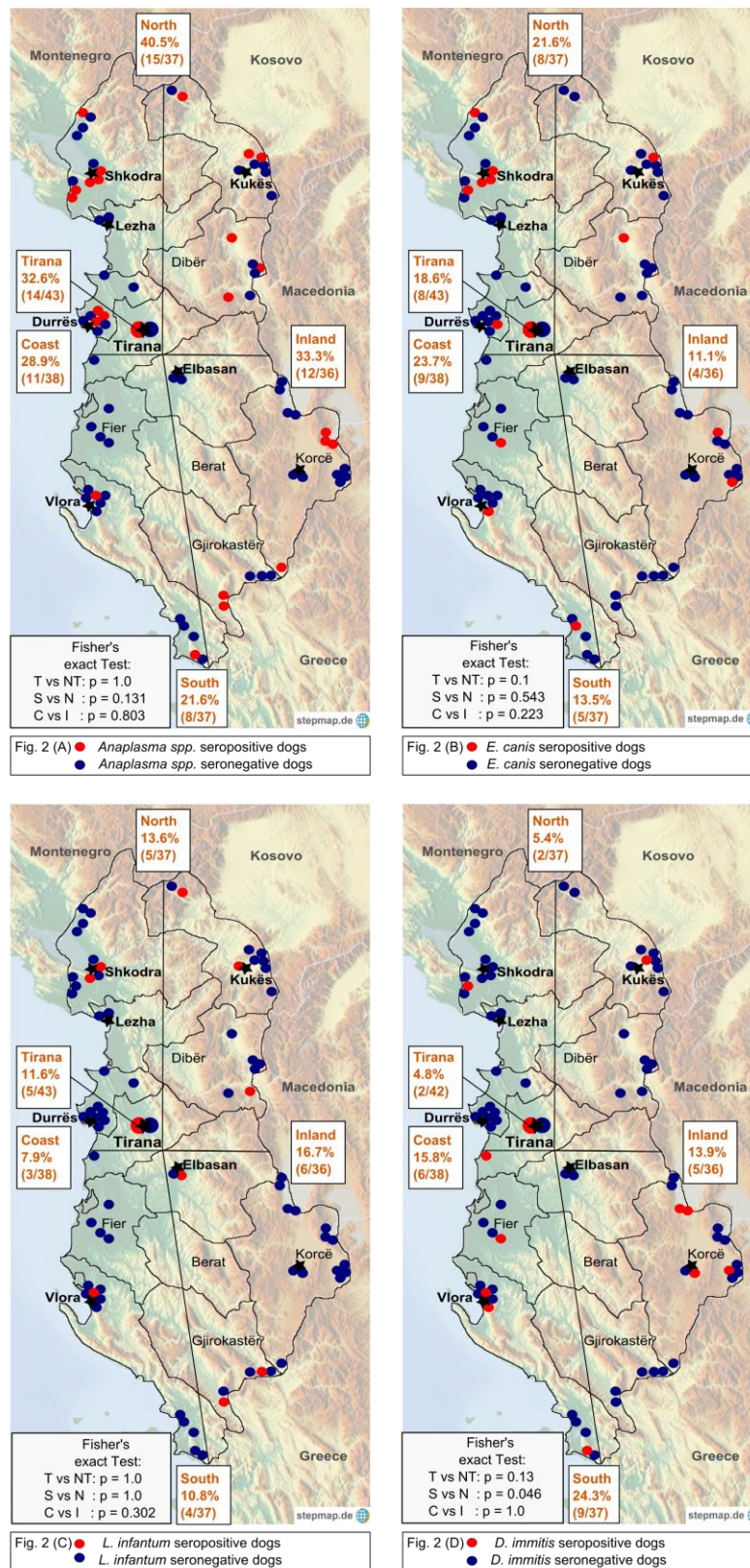


Fig. 2: Geographic distribution in Albania of the police dogs tested for antibodies to *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum*, and *Dirofilaria immitis* antigen.

Black lines divide non-Tirana (NT) Albania into areas - south Albania (S) + north Albania (N) or coastal Albania (C) + interior (I) - while dogs based in the city of Tirana (T) form a separate group. Prevalence of exposure was analysed as follows: T vs. NT, S vs. N and C vs. I.

## 2.2. Pathogen detection by PCR

DNA was extracted from the EDTA-blood samples with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (QIAamp DNA MiniKit, Qiagen, Hilden, Germany). Quantity and quality of the extracted DNA were evaluated with a spectrophotometer (NanoDrop ® 1000, Peqlab, Erlangen, Germany). For the detection of DNA of *Babesia* spp., haemotropic mycoplasmas and *H. canis*, conventional PCRs were carried out on a MASTERCYCLER®gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the Qiagen HotStarTaq Polymerase Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for *Babesia* spp. and the HotMaster Taq DNA Polymerase (5-Prime, Eppendorf, Hamburg, Germany) for *H. canis* and haemotropic mycoplasmas. Positive and negative controls were included in every PCR run. After electrophoresis in a 2% agarose gel containing GelRed™ (Biotium, Hayward, USA), the amplified PCR-products were analysed under UV-light. Real-time PCRs were conducted to detect DNA of *E. canis*, *Anaplasma platys*, *A. phagocytophilum* and *L. infantum*, using the TAQMAN® GENEEXPRESSION Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) kit for *E. canis* and *A. phagocytophilum* and the TAQMAN® UNIVERSAL PCR Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) for *A. platys* and *L. infantum* on the Applied Biosystem 7500fast real-time PCR cycler according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Table 1 summarizes the respective target genes, primers, cycle conditions and controls for each PCR assay.

Table 1. : PCR and real-time PCR methods used for investigating police dogs from Albania for vector-borne pathogens

Target	Primers 5' - 3'	Cycle conditions	Positive Control	Reference
<b>Conventional PCR methods</b>				
<b><i>Babesia</i> spp. 18S rRNA gene</b>	BJ1 : GTCTTGTAATTGGAATGATGG BN2: TAGTTTATGGTTAGGACTACG	95°C 5 min 40 cycles: 94°C 30sec  54°C 30 sec  72°C 40 sec 72°C 5 min	Genomic <i>B. divergens</i> DNA from bovine EDTA-blood 1:100 dilution	(Casati et al., 2006)

<b><i>Hepatozoon canis</i></b> <b>18S rRNA gene</b>	Hep-F_for: ATACATGAGCAAATCTCAAC Hep-R_rev: CTTATTATTCCATGCTGCAG	94°C 2 min 34 cycles : 95°C 30sec  57°C 30 sec  72°C 90 sec 72°C 5min	pEX-A- <i>Hepatozoon</i> <i>canis</i> 1:128.000.000 dilution* <sup>1</sup>	(Inokuma et al., 2002)
<b><i>Mycoplasma haemocanis/</i></b> <b><i>Candidatus M. haematoparvum</i></b> <b>16S rRNA gene</b>	OHOK1_for: ATGCCCCTCTGTGGGGGATAGCCG CaB2_for: CTGGGAAACTAGAGCTTCGCGAGC OOCBr1_rev: ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG	94 °C 2 min 35 cycles: 94°C 45sec,  58°C 45sec  72°C 45sec 72°C 5 min	pEX-A- <i>Mycoplasma</i> <i>haemominutum</i> 1:256.000.000 dilution pEX-A- <i>Mycoplasma</i> <i>haemofelis</i> 1:2048000000 dilution* <sup>1</sup>	(Watanabe et al., 2003)
<b>Real-time PCR methods</b>				
<b><i>Anaplasma platys</i></b> <b>16S rRNA gene</b>	EPlat-19f : CGGATTTTGTCTAGCTTGCTAT EPlat-117r: CCATTTCTAGTGGCTATCCCACTACT EPlat-55p-S1: FAM- TGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGA- BHQ1	95°C 20 sec 40 cycles: 95°C 30 sec  60°C 30 sec	Genomic A. <i>platys</i> DNA from canine EDTA blood 1:10 dilution	(Teglas et al., 2005)
<b><i>Anaplasma phagocytophilum:</i></b> <b>Msp2 gene</b>	ApMSP2f: ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT ApMSP2r: TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA ApMSP2p-FAM: TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG	50°C 5 min 95°C 10 min 40 cycles: 95°C 15sec  60°C 1 min	A. <i>phagocytophilum</i> DNA from cell culture 1:10000 dilution	(Courtney et al., 2004)
<b><i>Ehrlichia canis</i></b> <b>p30-10-gene</b>	Ecanisp30-ANYF: TGGATACTACCATGGCGTTATTGG E.canisp30-ANYR: GAGGAGCATCATTAATACTACAGGAGTT E.canisp30-ANYM2: FAM- CAGGTATCTTCTCAAATTT-NFQ	50°C 2min 95°C 10 min 40 cycles: 95°C 15 sec  60°C 1 min	<i>E. canis</i> plasmid- DNA pEC-3.3 1:1000 dilution* <sup>1</sup>	(Ionita et al., 2013)
<b><i>Leishmania infantum</i></b> <b>Kinetoplast-DNA</b>	Lsh-kF: CTTTTCTGGTCTCCGGGTAGG Lsh-kR: CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA Lsh-kp: FAM-  TTTTTCGCAGAACGCCCCCTACCCGC-BHQ1	95°C 20 sec 40 cycles: 95°C 30 sec  60°C 30 sec	<i>L. infantum</i> DNA from cell culture 1:1000 dilution	(Mary et al., 2004)

\*<sup>1</sup>Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany

### 2.3. Serum analyses

Serum samples of 117 dogs were analysed by indirect fluorescent antibody tests

(IFAT) to detect IgG antibodies against the coccidian parasites *T. gondii* and *N. caninum* and the vector-borne pathogens *R. conorii*, *E. canis*, *Anaplasma* spp., *B. canis* and *L. infantum*. Commercial IFAT test-kits [MegaScreen® FLOURICKETTSIA con, MegaScreen® FLOUEHRLICHIA c., MegaScreen® FLOUANAPLASMA ph., MegaScreen® FLOUBABESIA c., MegaScreen® FLOUTOXOPLASMA gondii, MegaScreen® FLOUNEOSPORA c.,] (MegaCor, Hörbranz, Austria) were used. Antibodies against *L. infantum* were tested by an in-house IFAT with *L. infantum* promastigotes extracted from cell culture used as antigens (Mancianti *et al.*, 1995). Positive controls for *T. gondii*, *N. caninum* and *R. conorii* were included in the test-kits. For *E. canis*, *Anaplasma* spp., *B. canis* and *L. infantum* serum samples with corresponding titres of 1:10240, >1:800, 1:2048 and 1:1280 were provided by the diagnostic centre of the Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Munich as positive controls and negative serum samples for the respective pathogens as negative controls. For all tests, fluorescent conjugated anti-dog IgG [Anti-Dog IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in rabbits, Sigma-Aldrich®, St Louis, USA] at a 1:64 dilution was used. For screening, dilutions of 1:50 (*T. gondii*, *N. caninum*, *Anaplasma* spp.), 1:64 (*R. conorii*), 1:40 (*E. canis*) and 1:32 (*L. infantum*, *B. canis*) were used. Samples with positive reactions were diluted serially for *T. gondii*, *N. caninum* and *Anaplasma* spp. (1:50 to 1:800), for *R. conorii* (1:64 to 1:1024), for *E. canis* (1:40 to 1:640) and for *L. infantum* and *B. canis* (1:64 to 1:512). Titres of  $\geq 1:50$  (*Anaplasma* spp.),  $\geq 1:40$  (*E. canis*), or  $\geq 1:64$  (*R. conorii*, *B. canis*, *L. infantum*) were considered as positive. To minimize the impact of false positive results, a cut-off titre of 1:100 for *T. gondii* and *N. caninum* was defined.

Because of shortage of serum from two dogs deployed in the city of Tirana, out of the 117 samples one was not screened for antibodies against Spotted Fever Group (SFG) rickettsiae and another one was not screened for *D. immitis* antigen. Consequently, only 115 dogs were screened with all serological tests.

An ELISA containing purified *Rickettsia rickettsii* antigen which also reacts against antigen of *R. conorii*, *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia africae*, was used for testing 116 serum samples for IgG-antibodies against SFG rickettsiae [Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit, Fuller Laboratories, Fullerton, USA] according to the manufacturer's instructions. For detection of antigen of adult female *D. immitis*, a commercial ELISA kit [DIROCHEK® canine Heartworm

Antigen Test Kit, Synbiotics Corp., San Diego, USA] was used according to the manufacturer's instructions.

#### 2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with IBM SPSS Version 22.0 and Bias for Windows Version 10.04. For pathogen prevalence and exposure, the exact 95% confidence interval was computed using the Clopper and Pearson method. To obtain information of association between results (serological tests only) and gender, age or geographical location of the dogs, Fisher's exact test was applied. For age, at first all three age groups were compared simultaneously and afterwards pairwise comparisons were made. The Fisher's exact test was also used to assess the association of the concurrent exposure to *T. gondii* and *N. caninum* and to two vector-borne pathogens. Differences at  $p \leq 0.05$  were considered significant. In case of significant differences associated with the geographical location of the dogs, the odds ratio [OR] was calculated. For the evaluation of exposure of the dogs to multiple pathogens, positive *R. conorii*-IFAT and SFG rickettsiae ELISA results were combined as 'SFG rickettsiae positive'.

### 3. Results

#### 3.1. Direct pathogen detection by PCR

Screening 119 EDTA blood samples for pathogens by molecular methods resulted in two dogs that tested positive for *A. platys* (1.7%, CI: 0.2-5.4) and four dogs that tested positive for *L. infantum* (3.4%, CI: 0.9-8.4). The *A. platys* positive samples were negative for *A. phagocytophilum*, which thus confirmed the diagnosis of *A. platys*. All 119 samples were negative for DNA of *E. canis*, *Babesia* spp., *H. canis*, *M. haemocanis* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*.

#### 3.2. Serum analyses

Altogether 65% (76/117, CI: 55.6-73.6) of the dogs were seropositive for antibodies against *T. gondii* and/or *N. caninum* and almost 90% (103/117, CI: 80.7-93.3) were seropositive for antibodies against vector-borne pathogens. Seven dogs were seronegative and PCR-negative for all examined pathogens. Of these dogs, five were from Tirana and five were one year old or younger.

The most prevalent findings were antibodies against SFG rickettsiae (ELISA) (71.5%, CI: 62.4-79.5) and *R. conorii* (IFAT) (61.5%, CI: 52.1-70.4), followed by *T. gondii* antibodies (65.0%, CI 55.6-73.6). Exposures to the other pathogens were:

31.6% (CI: 23.3-40.9) for *Anaplasma* spp., 17.9% (CI: 11.5-26.1) for *E. canis*, 12% (CI: 6.7-19.3) for *L. infantum*, 12% (CI: 6.7-19.3) for *N. caninum* and 3.4% (CI: 0.9-8.5) for *B. canis*; the corresponding endpoint titres are presented in Fig. 3. Total 11.2% (CI: 6.1-18.4) of the samples tested positive for *D. immitis* antigen (Table 2). Comparison of seroprevalence percentages in male and female dogs revealed no statistically significant differences for any of the investigated pathogens. Details of seroprevalence percentages according to the three age groups are shown in Table 2. Significant differences were found with respect to the exposure to SFG rickettsiae, *Anaplasma* spp., *L. infantum* and *T. gondii* ( $p \leq 0.05$ ). *B. canis* was not considered because only four dogs were seropositive.

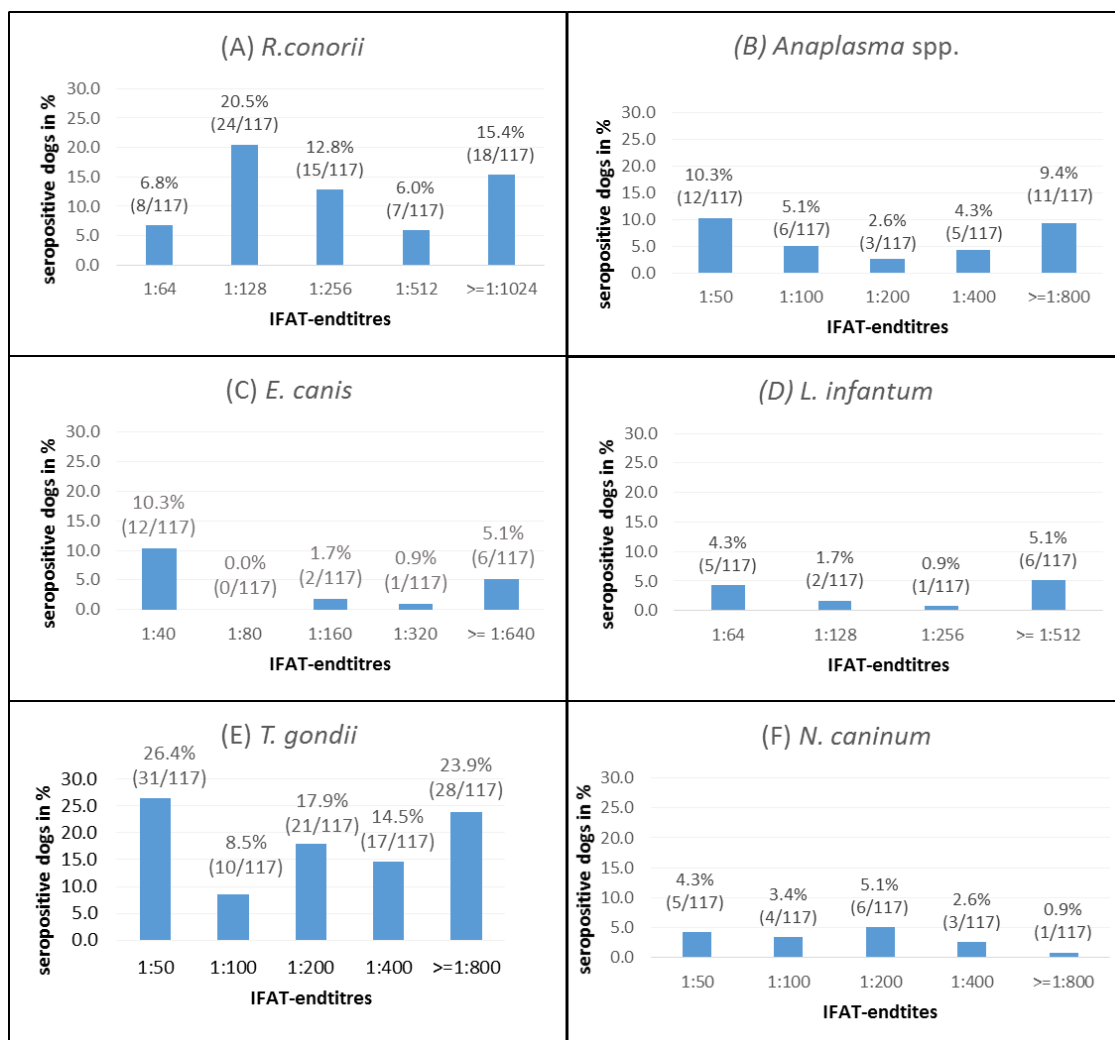


Fig. 3: IFAT endpoint titres for antibodies to *Rickettsia conorii*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*.

Table 2: Details of dogs tested for exposure to vector-borne pathogens, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as well as for *Dirofilaria immitis* antigen in Albania according to age group

Pathogen (Method)	Seropositive dogs				Fisher's Exact Test <sup>a</sup>
	All dogs	Young dogs (10 months – 3 years)	Adult dogs (>3 - 7 years)	Old dogs (>7-10 years)	
<i>Toxoplasma gondii</i> (IFAT)	65% (76/117)	47.2% (17/36)	65.5% <sup>b</sup> (38/58)	91.3% <sup>c</sup> (21/23)	p=0.002
<i>Neospora caninum</i> (IFAT)	12% (14)/117	5.5% (2/36)	12% (7/58)	21.7% (5/23)	p=0.18
SFG rickettsiae (ELISA)	71.5 % (83/116))	41.7% <sup>d</sup> (15/36)	80.7% (46/57)	95.6% <sup>c</sup> (22/23)	p< 0.001
<i>Rickettsia conorii</i> (IFAT)	61.5% (72/117))	58.3% (21/36)	65.5% (38/58)	56.5% (13/23)	p=0.66
<i>Anaplasma</i> spp. (IFAT)	31.6% (37/117)	13.8% <sup>d</sup> (5/36)	39.6% (23/58)	39.1% <sup>c</sup> (9/23)	p= 0.02
<i>Ehrlichia canis</i> (IFAT)	17.9% (21/117)	13.8% (5/36)	13.8% (8/58)	34,7% (8/23)	p=0.09
<i>Babesia canis</i> (IFAT)	3.4% (4/117)	0% (0/36)	5.1% (3/58)	4.4% (1/23)	Not done
<i>Leishmania infantum</i> (IFAT)	12% (14/117)	2.7% (1/36)	12% (7/58)	26% <sup>c</sup> (6/23)	p= 0.02
<i>Dirofilaria immitis</i> (ELISA)	11.2% (13/116)	2.7% (1/36)	13.8% (8/58)	18.2% (4/22)	p= 0.10

<sup>a</sup> Comparison of the three age groups

<sup>b</sup> p<0.05, adult dogs vs. old dogs

<sup>c</sup> p<0.05, old dogs vs. young dogs

<sup>d</sup> p<0.05, young dogs vs. adult dogs

Three *B. canis* seropositive dogs were from Shkodra and one was from Korçë. Exposure to all other pathogens was found in dogs deployed in each region of Albania (Fig. 1 and 2). The prevalence of *D. immitis* was significantly lower in North Albania than in South Albania (p=0.046, OR=5.6). No statistically significant geographical difference was found for exposure to any other pathogen (Fig. 1 and 2).

### 3.3. Occurrence of co-exposure to pathogens

Any dog that tested seropositive for *N. caninum* was also seropositive for *T. gondii* and a significant association for the exposure to these two parasites was found (p=0.002). Exposure to more than one and up to five agents was found in 51.5% out of the 103 dogs that were seropositive for at least one vector-borne (53/103, CI: 41.4-61.4). Antibody positivity to *Anaplasma* spp. and SFG rickettsiae (25.9% (30/116), CI: 18.2-34.8) or *R. conorii* (23.9% (28/117), CI: 16.5-32.7) were the most commonly observed combination (Tab. 3). A significant correlation between SFG rickettsiae (ELISA) and *R. conorii* (IFAT) results was seen (p=0.01). The

simultaneous presence of antibodies against two vector-borne pathogens was statistically significant for the following pairings: *Anaplasma* spp. and *E. canis*; *E. canis* and *B. canis*; *Anaplasma* spp. and *R. conorii* (IFAT) (Tab. 3). Details of the multiple exposures to vector-borne pathogens are presented in Table 4.

Of the 115 dogs which were analysed for exposure to all eight pathogens (including *T. gondii* and *N. caninum*; exposure to *R. conorii* and SFG rickettsiae was combined as ‘SFG rickettsiae positive’ in this calculation), 21 dogs (18.3%, CI 11.7-26.6) had antibodies against four pathogens or more.

Table 3: Occurrence of co-exposure to vector-borne pathogens detected by serological methods in police dogs from Albania

<b>Vector-borne pathogens (method)</b>	<b>SFG rickettsiae (ELISA)</b>	<b><i>Rickettsia conorii</i> (IFAT)</b>	<b><i>Anaplasma</i> spp. (IFAT)</b>	<b><i>Ehrlichia canis</i> (IFAT)</b>	<b><i>Babesia canis</i> (IFAT)</b>	<b><i>Leishmania infantum</i> (IFAT)</b>
<i>Anaplasma</i> spp. (IFAT)	N <sup>1</sup> = 30/116 (25.9%) p <sup>2</sup> = 0.08	N = 28/117 (23.9%) p = 0.04				
<i>Ehrlichia canis</i> (IFAT)	N = 18/116 (15.5%) p = 0.06	N = 16/117 (13.7%) p = 0.15	N = 14/117 (12.0%) p = 0.0004			
<i>Babesia canis</i> (IFAT)	N = 4/116 (3.4%) p = 0.58	N = 3/117 (2.6%) p = 1	N = 2/117 (1.7%) p = 0.59	N = 3/117 (2.6%) p = 0.02		
<i>Leishmania infantum</i> (IFAT)	N = 13/116 (11.2%) p = 0.07	N = 9/117 (7.7%) p = 1	N = 7/117 (6.0%) p = 0.13	N = 5/117 (4.3%) p = 0.13	N = 2/117 (1.7%) p = 0.07	
<i>Dirofilaria immitis</i> (ELISA)	N = 11/115 (9.6%) p = 0.35	N = 10/116 (8.2%) p = 0.37	N = 3/116 (2.6%) p = 0.55	N = 5/116 (4.3%) p = 0.06	N = 1/116 (0.9%) p = 0.38	N = 1/116 (0.9%) p = 1

<sup>1</sup> N = number of seropositive dogs for two pathogens/number of dogs tested, (%)

<sup>2</sup> p-values for testing the association of concurrent exposure with Fisher’s exact test



Table 4: Number of police dogs from Albania that tested seropositive for multiple vector-borne pathogens

Pathogens <sup>1</sup>	Number of Dogs
<b>Dogs seropositive for two pathogens</b>	<b>34</b>
<i>Ap</i> + SFGR	18
<i>Di</i> + SFGR	6
<i>Ec</i> + SFGR	4
<i>Li</i> + SFGR	4
<i>Bc</i> + SFGR	1
<i>Ap</i> + <i>Ec</i>	1
<b>Dogs seropositive for three pathogens</b>	<b>12</b>
<i>Ap</i> + <i>Ec</i> + SFGR	7
<i>Ap</i> + SFGR + <i>Li</i>	3
<i>Ec</i> + SFGR + <i>Di</i>	1
<i>Ap</i> + SFGR + <i>Di</i>	1
<b>Dogs seropositive for four pathogens</b>	<b>5</b>
<i>Ec</i> + <i>Ap</i> + SFGR + <i>Li</i>	2
<i>Ec</i> + SFGR + <i>Di</i> + <i>Bc</i>	1
<i>Ec</i> + <i>Ap</i> + SFGR + <i>Di</i>	1
<i>Ec</i> + SFGR + <i>Di</i> + <i>Li</i>	1
<b>Dogs seropositive for five pathogens</b>	<b>2</b>
<i>Ap</i> + <i>Ec</i> + SFGR + <i>Li</i> + <i>Bc</i>	2
<b>Total</b>	<b>53</b>

<sup>1</sup> *Ap* = *Anaplasma* spp.; SFGR = SFG rickettsiae ELISA- and/or *R. conorii* IFAT-positive;

*Di* = *Dirofilaria immitis*; *Ec* = *Ehrlichia canis*; *Bc* = *Babesia canis*; *Li* = *Leishmania infantum*

## 4. Discussion

### 4.1. *T. gondii*

*T. gondii* infections usually cause no or only mild clinical manifestations in warm blooded animals and humans worldwide (Dubey, 2010). However, it can be responsible for congenital death, ocular lesions and severe disease especially in immunocompromised individuals (Dubey, 2010). The sexual enteric cycle takes place only in felids excreting oocysts. However, due to their coprophagic habits and rolling in faeces dogs may contribute to the spread of infection (Lindsay et al., 1997, Frenkel et al., 2003). We determined 65% of the canine serum samples as seropositive demonstrating an exposure level on the upper limit of the range of data reported worldwide (Dubey, 2010). A similar exposure level was found in client-owned dogs from Albania recently (Hamel et al., 2016). The police dogs from Albania are fed with commercial dry dog food, but raw meat consumption cannot be fully excluded. The high seroprevalence may also be indicative of a high contamination with *Toxoplasma* oocysts in the environment of the police dogs. Consumption of poorly cooked meat and soil exposure were identified as risk factor for *Toxoplasma* seropositivity in women from Albania, Macedonia and Serbia (Djurkovic-Djakovic et al., 2010, Bobic et al., 2007). In previous studies, 63.2% of

cats from Tirana and nearly 50% of pregnant women from Albania had antibodies against *T. gondii*. Both rates are among the highest seroprevalence levels in cats and humans from Eastern European countries (Silaghi et al., 2014, Maggi et al., 2009, Bobic et al., 2011) and support our findings. Although we defined a higher cut-off titre in our study than most other authors, distinctly lower percentage-prevalence was reported from Serbia (41% (Sibalic, 1977)), Greece (21.2-30.8% (Chambouris et al., 1989)) and Bulgaria (11.2% (Kostova et al., 1999)). Similar results were recorded in Turkey (62%-94%) (Icen et al., 2010, Aslantas et al., 2005). Consistent with other studies, a statistically significant difference among the age groups was seen: 91.2% of the dogs older than seven years were seropositive which supports a pattern of cumulative exposure risk over time and long-lasting antibody persistence (Cabezón et al., 2010, Aslantas et al., 2005).

#### **4.2. *N. caninum***

*N. caninum* causes abortions in bovines worldwide with dogs and coyotes being the only definitive host known to excrete oocysts (McAllister et al., 1998, Gondim et al., 2004). The *N. caninum* seroreactivity of 12% in the police dogs from Albania was within the range reported in other studies in Europe (Dubey & Schares, 2011) and very similar to the findings of Hamel et al. (Hamel et al., 2016) who examined client-owned dogs from Albania. In agreement with previous reports, we did not find a significant correlation of exposure level and age (Azevedo et al., 2005, Rasmussen & Jensen, 1996). Some other authors reported age to be a risk factor (Capelli et al., 2004, Collantes-Fernandez et al., 2008) indicating horizontal transmission being more important than vertical transmission. Some infected dogs were shown to become seronegative within a year while others had persisting high titres over years (Vaclavek et al., 2007). Seropositivity and oocyst shedding however are not correlated (McAllister et al., 1998, Lindsay et al., 1999). Although serological cross reactions between *N. caninum* and *T. gondii* rarely occur, and should not account for when using cut-off titres of 1:100 (Dubey & Lindsay, 1996, Azevedo et al., 2005, Wanha et al., 2005, Silva et al., 2007), a significant association of exposure to these agents was observed as reported previously (Vaclavek et al., 2007). Thus, the occurrence of cross-reaction cannot be excluded but co-infections have to be considered as well (Yildiz et al., 2009).

#### **4.3. Spotted Fever Group rickettsiae**

Consistent with our findings high seroprevalences for antibodies against SFG rickettsiae in dogs, ranging from 52% to 72%, were recorded in Greece (Mylonakis et al., 2004), Croatia (Punda-Polić et al., 1995), and Italy (Pennisi et al., 2012). The high exposure level to *R. conorii* and/or other SFG rickettsiae in the police dogs from Albania implicates an infection risk for humans in Albania. *Rickettsia conorii* and *Rickettsia helvetica* have been isolated from ticks from Albania previously (Christova et al., 2003). The situation in the human population in Albania is largely unknown. However, over the period of 1960 to 2001, rickettsioses (without specification) were documented as subject of mandatory reporting in Albania with an annual average of 33 cases (Kakarriqi, 2002) and one of 34 patients with suspected Crimean Congo Haemorrhagic Fever was diagnosed serologically with rickettsiosis (Papa et al., 2008). DNA of *R. slovaca*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia aeschlimanii* has been detected in ticks from Greece (Psaroulaki et al., 2003, Kachrimanidou et al., 2010, Psaroulaki et al., 2006, Psaroulaki et al., 2005b), Serbia (Radulovic et al., 2011, Tomanovic et al., 2013), and Croatia (Punda-Polić et al., 2002). All these SFG rickettsiae, except *R. rhipicephali*, are known to cause febrile illness in humans (Parola et al., 2013). Human infections with *R. sibirica mongolitimonae*, *R. aeschlimanii* and *R. conorii* were registered in Greece (Germanakis et al., 2013, Psaroulaki et al., 2005a, Psaroulaki et al., 2005b) and Croatia (Sardelic et al., 2003). In Serbia, one of the highest seroreactivities in humans from Europe (up to 23% in mountainous areas) has been reported (Parola et al., 2005, Samardzic et al., 2008, Parola et al., 2013). Serological cross reaction between different *Rickettsia* species occurs (Pennisi et al., 2012, Waner et al., 2001, Allison & Little, 2013). Thus, other SFG rickettsiae may be responsible for positive *R. conorii* IFAT-results (Parola et al., 2013). A survey from Croatia (Punda-Polić et al., 1995) revealed a considerably regional variability in the seroprevalence of *R. conorii* whereas no geographical variability was observed in the present study. In the present study, significant differences between the age groups were observed for SFG rickettsiae antibodies but not for *R. conorii* seropositivity. This disparity may be explained by underlying infections of other *Rickettsia* species. In most studies, seroreactivity to *R. conorii* only was evaluated and both association to age (Punda-Polić et al., 1995) and no association to age (Segura-Porta et al., 1998) as well as short or long antibody persistence were seen (Tesouro et al., 1998, Espejo et al., 1993).

#### 4.4. *Anaplasma* spp.

Infections of dogs with *Anaplasma phagocytophilum* and *A. platys* cause canine granulocytic anaplasmosis and canine cyclic thrombocytopenia, respectively (Greene & Craig, 2006). *A. platys* infections in dogs from South Eastern Europe were reported previously from Croatia, Romania and Greece (Dyachenko et al., 2012, Kontos et al., 1991, Andersson et al., 2013) and only recently for the first time in client-owned dogs from Albania (Hamel et al., 2015). Xhaxhui et al. (Xhaxhiu et al., 2009) examined dogs from Albania for ectoparasites and found brown dog ticks, *Rhipicephalus sanguineus* (presumed vector of *A. platys*), on almost 25% of them. The infestation rate with *Ixodes ricinus* however, the main vector of *A. phagocytophilum* in Europe (Carrade et al., 2009), was only 0.6% which may explain why *A. phagocytophilum* DNA was not detected in the blood of the police dogs. Nonetheless, the detection of *A. phagocytophilum* in canine blood samples from Albania (Hamel et al., 2016) and Romania (Hamel et al., 2012), and one case report of canine granulocytic anaplasmosis from Bulgaria (Tsachev et al., 2008) implicate an existing infection-risk for dogs in the region. The overall *Anaplasma* spp. seroprevalence was 31.6%. A similar seroprevalence (40%) was reported recently in semi-domesticated dogs from Albania (Hamel et al., 2009) while lower percentage-prevalence (3.4% to 8.3%) was found in dogs in other Southeast European countries (Hamel et al., 2012, Mircean et al., 2012, Stefanovska et al., 2012, Pavlovic et al., 2012). As in other studies (Ebani et al., 2013, Egenvall et al., 2000), *Anaplasma* spp. seroreactivity in the police dogs was significantly lower in young dogs compared to adult and old dogs. Serological cross reactions exist for *A. phagocytophilum* and *A. platys* (Santos et al., 2009). Therefore, positive *A. phagocytophilum*-IFAT results may result from exposure to *A. platys*. *R. conorii* and *A. platys* share the same tick vector (Socolovschi et al., 2009, Latrofa et al., 2014) explaining an association between these two pathogens which has also previously been found (Solano-Gallego et al., 2006). However, serological cross reactions between most members of the order Rickettsiales cannot be excluded (Allison & Little, 2013).

#### 4.5. *E. canis*

*E. canis* infections are mainly of veterinary concern (Harrus et al., 1997, Mylonakis et al., 2004). The seroprevalence level of 17.9% in the present study was within the lower half of the range obtained in studies from Romania (0.7%) (Hamel et al.,

2012), the former Republic of Macedonia (18.7%) (Stefanovska et al., 2012), Bulgaria (37.5%) (Tsachev et al., 2006) and Greece (41.2%) (Jensen et al., 2003). Hamel et al. (Hamel et al., 2009) reported a seroprevalence of 50% in dogs from suburban areas in Tirana. As observed in other studies, no age or gender disposition was found (Jensen et al., 2003, Tsachev et al., 2006). As German shepherd dogs appear to be more susceptible to *E. canis* infections than other breeds (Harrus et al., 1997, Nyindo et al., 1980), police officers and veterinarians should take appropriate measures for these dogs in order to minimize the transmission of the pathogen and/or to correctly diagnose and treat the disease (Mylonakis et al., 2004, Harrus et al., 1997). All *E. canis* seropositive dogs had antibodies against SFG rickettsiae and/or *Anaplasma* spp. Cross reactions between *A. phagocytophilum* and *E. canis* have been described, and the occurrence of cross reaction of SFG rickettsiae and *E. canis* cannot be fully excluded (Waner et al., 2001, Harrus & Waner, 2011, Allison & Little, 2013). Detection of *E. canis* antibodies was associated significantly with seropositivity to *B. canis* and *Anaplasma* spp. Apart from the possible occurrence of serological cross reactions, co-infections are likely as *E. canis*, *A. platys* and *Babesia vogeli* share the same vector tick, *R. sanguineus* (Socolovschi et al., 2009, Groves et al., 1975, Simpson et al., 1991).

#### **4.6. *B. canis***

A total of 3.4% of the police dogs from Albania showed positive *Babesia canis* IFAT results. Studies performed earlier in Albania demonstrated 9.9% and 13.3% of the dogs as seropositive (Hamel et al., 2009, Lazri et al., 2008). The *Babesia canis* IFAT is however not entirely species specific (Yamane et al., 1993). No police dogs in this study was *Babesia* spp. PCR-positive, therefore no information as to which species may have induced the positive IFAT results can be provided. The presence of both *B. canis* and *B. vogeli* has been proved in dogs from Albania with *B. canis* being more often identified (Lazri et al., 2008, Hamel et al., 2009).

#### **4.7. *L. infantum***

Dogs are known as the main reservoir for *L. infantum* for human infection (Dantas-Torres, 2007), and the stray dog population was discussed as factor for increasing human visceral leishmaniasis in Albania (Velo et al., 2003). None of the police dogs showed clinical signs related to canine leishmaniasis. In fact, most dogs that are infected with *L. infantum* remain asymptomatic but the development of a chronic

course of the disease is not uncommon (Baneth et al., 2008). Comparing the prevalence level in the police dogs (12%) with dogs from other Balkan countries, similar or higher exposure levels have been reported from Croatia (15%) (Živičnjak et al., 2005), the former Yugoslav Republic of Macedonia (34.7%) (Stefanovska et al., 2012) and Greece (20-24.4%) (Papadopoulou et al., 2005, Athanasiou et al., 2012). Seropositive police dogs in Albania were deployed in nearly all counties, and no difference in the geographical distribution was observed. It should, however, be considered that all police dogs were raised in Tirana where the infection with *L. infantum* could have taken place. Competent vectors of *L. infantum* are abundant in country, and their occurrence was documented for the district and city of Tirana (Velo et al., 2005, Velo et al., 2003). The regular washings with Neostomosan® have apparently no effect on the exposure of the police dogs to the vectors of *L. infantum* as other studies from Albania with dogs of unknown or lower level of care veterinary found similar or even lower percentage-prevalence (4.6% to 10.6%) (Lazri et al., 2008, Hamel et al., 2009, Cricko et al., 1999, Bizgha et al., 2013). Based on serology no significant difference in the exposure level to *L. infantum* was found with respect to gender. This matches with a survey from Greece (Athanasiou et al., 2012), but differs from studies from Croatia (Živičnjak et al., 2005) and Spain (Fisa et al., 1999) where a significantly higher seroprevalence in male dogs was recorded. Compared to young dogs, significantly more old police dogs had *L. infantum* antibodies. An increase of seropositivity with age was reported in other in another study, too (Papadopoulou et al., 2005). Athanasiou et al. observed lower prevalence in very young dogs (<1 year) and old dogs (>9 years) (Athanasiou et al., 2012). Thus gender and age dispositions in *L. infantum* infections in dogs remain unclear.

IFAT has a high specificity and sensitivity to evaluate *L. infantum* exposure especially in clinically suspect dogs (Maia & Campino, 2008, Mettler et al., 2005). However, apparently healthy dogs were examined in this study. Seroconversion can occur months or even several years after infection (Oliva et al., 2006). Early infection can only be diagnosed by PCR or other more invasive direct methods. In the present study, three of the four PCR-positive dogs had high antibody-titres and one dog was seronegative. Based on blood sample screening, some authors observed more dogs being positive by indirect than by direct methods which agrees with our findings (Hamel et al., 2012, Lazri et al., 2008). Others found PCR being

more sensitive (Wang et al., 2011, Chargui et al., 2009). PCR from tissue samples (e. g., skin, lymph nodes and bone marrow) is considered more sensitive than from blood samples (Manna et al., 2008, Maia et al., 2009, Strauss-Ayali et al., 2004).

#### 4.8. *H. canis*

In two previous studies, *H. canis* was detected in 17% or 52.8% of canine blood samples that mainly originated from not well cared-for dogs in Albania (Hamel et al., 2009, Lazri et al., 2008). In contrast, none of the police dogs from Albania was PCR-positive. Dogs presumably get infected by ingesting infected *R. sanguineus* ticks, most likely while grooming or feeding prey infested with ticks (Baneth, 2006). Reasons for the absence of *H. canis* from the police dogs are unclear. The regular feeding of the dogs with commercial dog food likely prevents them from feeding of prey infested with ticks. However, there is evidence that the majority of the police dogs were exposed to *R. sanguineus* ticks as indicated through direct and/or indirect detection of several pathogens which are known or thought to be transmitted by *R. sanguineus*.

#### 4.9. *D. immitis*

The *D. immitis* prevalence in the police dogs of 11.2% is in the range of 3% to 13.5% which was established in previous studies from western Albania (Hamel et al., 2009, Lazri et al., 2008, Rapti & Rehbein, 2010). Hamel et al. (2016) found also microfilariae in three *D. immitis*-seropositive dogs and adult *D. immitis* specimen were detected in the right ventricle of one dog from Albania only recently (Xhaxhiu et al., 2011). Comparable prevalence rates (7% to 24%) were reported from the Kosovo, Serbia, Bulgaria and Macedonia (Hamel et al., 2009, Tasić et al., 2008, Georgieva et al., 2001, Stefanovska et al., 2012, Pavlovic et al., 2014). Concerning climatic conditions, the predicted annual average of heartworm generations in mosquitoes was 5-10 in the coastal Mediterranean part of Albania and 1-5 in the inland with a more continental climate (Genchi et al., 2005). Instead of the expected decrease in prevalence from west to east (Genchi et al., 2005, Rapti & Rehbein, 2010), a significant increase in prevalence from north to south was observed with a 5.6fold higher chance for dogs from south Albania to test positive. With higher average temperature and less rainfall in the south, climatic conditions differ between north and south Albania and are likely to affect the occurrence of the mosquitoes and the development of *D. immitis* in the intermediate host. In

accordance with our findings, only few *D. immitis* infected dogs were detected in a survey from the more northern Croatia (Živičnjak et al., 2007) while in the Greek prefecture Ioannina, which borders south Albania, a seroprevalence of 21.3 % was detected (Athanasίου et al., 2012). Consistent with several other authors, no significant difference was seen with regard to gender or age (Rapti & Rehbein, 2010, Tasić et al., 2008, Jensen et al., 2003, Selby et al., 1980).

The DIROCHEK® shows a high sensitivity (73.1%-96.2%) and specificity (94.0%-95.9%) (Atwell et al. 1988, Courtney and Zeng, 2001). Low worm burdens or infections with male worms only can reduce the sensitivity of this method (Courtney and Zeng, 2001) and antigen of immature adults can be detected only 5-6 months after infection. Thus false negative results are possible and the real *D. immitis*-infection rate of the police dogs could be even higher than the detected prevalence of 11.2%. It also has to be considered that cross-reactions between *Angiostrongylus vasorum* and *D. immitis*-antigen rarely occur (Schnyder and Deplazes, 2012).

#### **4.10. Haematropic mycoplasmas**

No sample from the police dogs was PCR-positive for *M. haemocanis* or *Cand. M. haematoparvum*. However, the occurrence of *M. haemocanis* in dogs from Albania was demonstrated recently (Hamel et al., 2016). Canine haematropic mycoplasma infection rates in Mediterranean countries were reported to range between 2.5% and 40% (Novacco et al., 2010, Hamel et al., 2012) including a prevalence of 10.6% found in a study from neighbouring Greece (Tennant et al., 2011).

### **5. Conclusion**

In this study, police dogs belonging to one breed mainly and sharing a similar history were examined at their actual locations throughout Albania. Considerable exposure rates without difference in geographical distribution of the zoonotic pathogens *T. gondii*, *Anaplasma* spp., *SFG rickettsiae*, *R. conorii* and *L. infantum* were found. However, dogs deployed in south Albania tested more frequently *D. immitis*-positive than dogs deployed in north Albania. Spending much time outdoors, police dogs may be considered as sentinels for the risk of exposure of their handlers' to pathogens and as indicators for the presence of pathogens in their environment.

**6. Acknowledgment:** We would like to thank Claudia Thiel and Andrea Mihalkov



for their excellent technical assistance, Carola Sauter-Louis for the statistical advice, Lavdrim Bella for support in sample collection and Dietmar Hamel for the critical comments on the manuscript.

Disclaimer: This document is provided for scientific purposes only. Any reference to a brand or trademark herein is for informational purposes only and is not intended for a commercial purpose or to dilute the rights of the respective owner(s) or brand(s) or trademark(s).

## References

- Allison, R. W. and S. E. Little, 2013: Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.*, **42**, 127-144.
- Andersson, M., M. A. Turcitu, M. Stefanache, P. Tamba, F. Barbuceanu and L. Chitimia, 2013: First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania--a case report. *Ticks Tick Borne Dis.*, **4**, 317-319.
- Aslantas, O., V. Ozdemir, S. Kilic and C. Babur, 2005: Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet. Parasitol.*, **129**, 187-191.
- Athanasίου, L. V., V. I. Kontos, M. N. Saridomichelakis, T. S. Rallis and A. Diakou, 2012: A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop.*, **122**, 291-295.
- Atwell, R., Sheridan, A., Baldock, F., 1988. An evaluation of the Dirochek test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Aust. Vet J.*, **65**, 161-162.
- Azevedo, S. S., C. S. A. Batista, S. A. Vasconcellos, D. M. Aguiar, A. M. A. Ragozo, A. A. R. Rodrigues, C. J. Alves and S. M. Gennari, 2005: Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res. Vet. Sci.*, **79**, 51-56.
- Baneth, G., 2006: *Hepatozoon canis* infection. In: Greene, CE, Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats, St Louis, MO: Elsevier Saunders*, 698-704.
- Baneth, G., A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau and L. Ferrer, 2008: Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*, **24**, 324-330.
- Beugnet, F. and J.-L. Marié, 2009: Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.*, **163**, 298-305.
- Bizgha, B., D. Laci, G. Dhamo, R. Keci and K. Belegu, 2013: Survey for Canine

- Leishmaniosis. *J. Anim. Vet. Adv.*, **12**, 442-446.
- Bobic, B., A. Nikolic, I. Klun and O. Djurkovic-Djakovic, 2011: Kinetics of *Toxoplasma* infection in the Balkans. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **123 Suppl 1**, 2-6.
- Bobic, B., A. Nikolic, I. Klun, M. Vujanic and O. Djurkovic-Djakovic, 2007: Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. *Parassitologia*, **49**, 227-230.
- Cabezón, O., J. Millan, M. Gomis, J. P. Dubey, E. Ferroglia and S. Almeria, 2010: Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol. Res.*, **107**, 1505-1508.
- Capelli, G., S. Nardelli, A. F. di Regalbano, A. Scala and M. Pietrobelli, 2004: Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Vet. Parasitol.*, **123**, 143-148.
- Carrade, D. D., J. E. Foley, D. L. Borjesson and J. E. Sykes, 2009: Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J. Vet. Intern. Med.*, **23**, 1129-1141.
- Casati, S., H. Sager, L. Gern and J. C. Piffaretti, 2006: Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **13**, 65-70.
- Chambouris, R., D. Stünzner, Z. Sebek, W. Sixl and M. Köck, 1989: Zur Toxoplasmose der Hunde in Griechenland. *Geogr. Med. Suppl.*, 19-22.
- Chargui, N., N. Haouas, M. Gorch, S. Lahmar, M. Guesmi, A. Ben Abdelhafidh, H. Mezhoud and H. Babba, 2009: Use of PCR, IFAT and in vitro culture in the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. *Parasite*, **16**, 65-69.
- Christova, I., J. Pol, S. Yazar, E. Velo and L. Schouls, 2003: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species, and Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from Southeastern Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**, 535-542.
- Collantes-Fernandez, E., M. Gomez-Bautista, G. Miro, G. Alvarez-Garcia, J. Pereira-Bueno, C. Frisuelos and L. M. Ortega-Mora, 2008: Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet. Parasitol.*, **152**, 148-151.
- Courtney, C.H., Zeng, Q., 2001. Comparison of heartworm antigen test kit

- performance in dogs having low heartworm burdens. *Vet. Parasitol.* **96**, 317-322
- Courtney, J. W., L. M. Kostelnik, N. S. Zeidner and R. F. Massung, 2004: Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3164-3168.
- Cricko, Z., S. Zanaj, I. Kusi and C. E., 1999: Kërkime mbi leishmaniozën kanine në Shqipëri. *Buletini i Shkencave Bujgesore*, **3**, 109-113.
- Dantas-Torres, F., 2007: The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.*, **149**, 139-146.
- Djurkovic-Djakovic, O., B. Bobic and I. Klun, 2010: Toxoplasmosis in Serbia: time for an action plan. *Parasite*, **17**, 187-192.
- Dubey, J. P., 2010: *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. CRC Press, Boca Raton.
- Dubey, J. P. and D. S. Lindsay, 1996: A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **67**, 1-59.
- Dubey, J. P. and G. Schares, 2011: Neosporosis in animals--the last five years. *Vet. Parasitol.*, **180**, 90-108.
- Dyachenko, V., N. Pantchev, H. J. Balzer, A. Meyersen and R. K. Straubinger, 2012: First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasit. Vectors*, **5**, 49.
- Ebani, V. V., F. Bertelloni, B. Turchi and D. Cerri, 2013: Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **20**, 289-292.
- Egenvall, A., B. N. Bonnett, A. Gunnarsson, A. Hedhammar, M. Shoukri, S. Bornstein and K. Artursson, 2000: Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991-94. *Scand. J. Infect. Dis.*, **32**, 19-25.
- Espejo, E., M. D. Alegre, B. Font, A. Font, F. Segura and F. Bella, 1993: Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: Seasonal differences. *Eur. J. Epidemiol.*, **9**, 344-346.
- Fisa, R., M. Gállego, S. Castillejo, M. J. Aisa, T. Serra, C. Riera, J. Carrió, J. Gállego and M. Portús, 1999: Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.*, **83**, 87-97.

- Frenkel, J. K., D. S. Lindsay, B. B. Parker and M. Dobesh, 2003: Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children. *Int. J. Infect. Dis.*, **7**, 292-293.
- Genchi, C., L. Rinaldi, C. Cascone, M. Mortarino and G. Cringoli, 2005: Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet. Parasitol.*, **133**, 137-148.
- Georgieva, D., Z. Kirikova and A. Ivanov, 2001: A study on the incidence and diagnostics of Dirofilariosis (heartworm disease) in carnivores. *Bulg. J. Vet. Med.*, **4**, 231-236.
- Germanakis, A., D. Chochlakis, E. Angelakis, Y. Tselentis and A. Psaroulaki, 2013: *Rickettsia aeschlimannii* infection in a man, Greece. *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1176-1177.
- Gondim, L. F. P., M. M. McAllister, W. C. Pitt and D. E. Zemlicka, 2004: Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 159-161.
- Greene, C. and E. Craig, 2006: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, St Louis, MO: Elsevier Saunders.
- Groves, M. G., G. L. Dennis, H. L. Amyx and D. L. Huxsoll, 1975: Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.*, **36**, 937-940.
- Hamel, D., E. Shukullari, D. Rapti, C. Silaghi, K. Pfister and S. Rehbein, 2016: Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. *Parasitol Res.* 115, 489-499.
- Hamel, D., C. Silaghi, M. Knaus, M. Visser, I. Kusi, D. Rapti, S. Rehbein and K. Pfister, 2009: Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **121 Suppl 3**, 42-45.
- Hamel, D., C. Silaghi, D. Lescai and K. Pfister, 2012: Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol. Res.*, **110**, 1537-1545.
- Harrus, S., P. H. Kass, E. Klement and T. Waner, 1997: Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.*, **141**, 360-363.

- Harrus, S. and T. Waner, 2011: Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.*, **187**, 292-296.
- Icen, H., C. Babur, S. Bademkiran, B. Celebi, A. Simsek, N. Ozyurtlu and A. T. Ozkan, 2010: Diyarbakır Bölgesindeki Sahipsiz Köpeklerde Toxoplasmosis, Leishmaniasis ve Listeriozisin Seroprevalansı. *Türkiye Parazitol. Derg.*, **34**, 6-10.
- Inokuma, H., M. Okuda, K. Ohno, K. Shimoda and T. Onishi, 2002: Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet. Parasitol.*, **106**, 265-271.
- Ionita, M., I. L. Mitrea, K. Pfister, D. Hamel and C. Silaghi, 2013: Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet. Parasitol.*, **196**, 71-76.
- Jensen, J., E. Müller and A. Dauschies, 2003: Für die Reisemedizin bedeutungsvolle arthropodenübertragene Infektionen bei Hunden in Griechenland. *Prakt. Tierarzt* **84**, 430-438.
- Kachrimanidou, M., E. Souliou, V. Pavlidou, A. Antoniadis and A. Papa, 2010: First detection of *Rickettsia slovaca* in Greece. *Exp. Appl. Acarol.*, **50**, 93-96.
- Kakarrqi, E. Z., 2002: Epidemiological background of infectious diseases in Albania (1960-2001) and their prevention and control in the context of natural disasters and infectious diseases. *Instituti i Shëndetit Publik, Tirana*.
- Kontos, V. I., O. Papadopoulos and T. W. French, 1991: Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet. Clin. Pathol.*, **20**, 101-105.
- Kostova, T., M. Halacheva, V. Marinova and G. Filipov, 1999: Studies on the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in dogs and the role of cats in the distribution of toxoplasmosis. *Bulg. J. Vet. Med.*, **2**, 191-196.
- Latrofa, M. S., F. Dantas-Torres, A. Giannelli and D. Otranto, 2014: Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis.*, **5**, 943-946.
- Lazri, T., G. Duscher, R. Edelhofer, B. Bytyci, P. Gjino and A. Joachim, 2008: Infektionen mit arthropodenübertragenen Parasiten bei Hunden im Kosovo und in Albanien unter besonderer Berücksichtigung der Leishmanieninfektionen. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **120**, 54-58.
- Levin, M. L., L. F. Killmaster and G. E. Zemtsova, 2012: Domestic dogs (*Canis*

- familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, **12**, 28-33.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey, J. M. Butler and B. L. Blagburn, 1997: Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.*, **73**, 27-33.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey and R. B. Duncan, 1999: Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, **82**, 327-333.
- lonelyplanet, 2011: Top 10 countries for 2011: Europe's got the goods, Available at: <http://www.lonelyplanet.com/europe/travel-tips-and-articles/76175> (accessed on 25 September 2015).
- Maggi, P., A. Volpe, V. Carito, N. Schinaia, S. Bino, M. Basho and P. Denticò, 2009: Surveillance of toxoplasmosis in pregnant women in Albania. *New Microbiol.*, **32**, 89-92.
- Maia, C. and L. Campino, 2008: Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.*, **158**, 274-287.
- Maia, C., J. Ramada, J. M. Cristóvão, L. Gonçalves and L. Campino, 2009: Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.*, **179**, 142-144.
- Mancianti, F., M. L. Falcone, C. Giannelli and A. Poli, 1995: Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, **59**, 13-21.
- Manna, L., S. Reale, F. Vitale, E. Picillo, L. M. Pavone and A. E. Gravino, 2008: Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.*, **177**, 279-282.
- Mary, C., F. Faraut, L. Lascombe and H. Dumon, 2004: Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5249-5255.
- McAllister, M. M., J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills and A. M. McGuire, 1998: Rapid communication: dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, **28**, 1473-1479.
- Mettler, M., F. Grimm, G. Capelli, H. Camp and P. Deplazes, 2005: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania*

- infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5515-5519.
- Mircean, V., M. O. Dumitrache, A. Gyorke, N. Pantchev, R. Jodies, A. D. Mihalca and V. Cozma, 2012: Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **12**, 595-604.
- Mylonakis, M. E., A. F. Koutinas, E. B. Breitschwerdt, B. C. Hegarty, C. D. Billinis, L. S. Leontides and V. S. Kontos, 2004: Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **40**, 174-184.
- Novacco, M., M. L. Meli, F. Gentilini, F. Marsilio, C. Ceci, M. G. Pennisi, G. Lombardo, A. Lloret, L. Santos, T. Carrapico, B. Willi, G. Wolf, H. Lutz and R. Hofmann-Lehmann, 2010: Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet. Microbiol.*, **142**, 276-284.
- Nyindo, M., D. L. Huxsoll, M. Ristic, I. Kakoma, J. L. Brown, C. A. Carson and E. H. Stephenson, 1980: Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am. J. Vet. Res.*, **41**, 250-254.
- Oliva, G., A. Scalone, V. Foglia Manzillo, M. Gramiccia, A. Pagano, T. Di Muccio and L. Gradoni, 2006: Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1318-1322.
- Otranto, D., F. Dantas-Torres and E. B. Breitschwerdt, 2009: Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol.*, **25**, 228-235.
- Papa, A., S. Bino, E. Papadimitriou, E. Velo, M. Dhimolea and A. Antoniadis, 2008: Suspected Crimean Congo Haemorrhagic fever cases in Albania. *Scand. J. Infect. Dis.*, **40**, 978-980.
- Papadopoulou, C., A. Kostoula, D. Dimitriou, A. Panagiou, C. Bobojianni and G. Antoniadis, 2005: Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J. Infect.*, **50**, 53-60.
- Parola, P., B. Davoust and D. Raoult, 2005: Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.*, **36**, 469-492.

- Parola, P., C. D. Paddock, C. Socolovschi, M. B. Labruna, O. Mediannikov, T. Kernif, M. Y. Abdad, J. Stenos, I. Bitam, P. E. Fournier and D. Raoult, 2013: Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, **26**, 657-702.
- Pavlovic, I., N. Milojkovic, L. Curcin, M. Kovacevic, N. Novak and O. Ivanovic, 2012: Prevalence of ehrlichiosis, anaplasmosis and borreliosis in dogs in Serbia. In: *Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, 330.
- Pavlovic, I., V. Terzi, B. Stankovic, D. Petkovic, P. Curcin, V. Antic, D. Terzin and K. Curcin, 2014: Prevalence of *Dirofilaria immitis* in pet and stray dogs in Belgrade area in period 2012-2013, fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary. 77.
- Pennisi, M. G., A. Capri, L. Solano-Gallego, G. Lombardo, A. Torina and M. Masucci, 2012: Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks Tick Borne Dis.*, **3**, 315-318.
- Psaroulaki, A., A. Germanakis, A. Gikas, E. Scoulica and Y. Tselentis, 2005a: First isolation and genotypic identification of *Rickettsia conorii* Malish 7 from a patient in Greece. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **24**, 297-298.
- Psaroulaki, A., A. Germanakis, A. Gikas, E. Scoulica and Y. Tselentis, 2005b: Simultaneous detection of "*Rickettsia mongolotimonae*" in a patient and in a tick in Greece. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 3558-3559.
- Psaroulaki, A., D. Ragiadakou, G. Kouris, B. Papadopoulos, B. Chaniotis and Y. Tselentis, 2006: Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **1078**, 389-399.
- Psaroulaki, A., I. Spyridaki, A. Ioannidis, T. Babalis, A. Gikas and Y. Tselentis, 2003: First isolation and identification of *Rickettsia conorii* from ticks collected in the region of Fokida in Central Greece. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3317-3319.
- Punda-Polić, V., N. Bradarić, Z. Klišmanić-Nuber, V. Mrljak and M. Giljanović, 1995: Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia. *Eur. J. Epidemiol.*, **11**, 389-392.
- Punda-Polic, V., M. Petrovec, T. Trilar, D. Duh, N. Bradaric, Z. Klismanic and T. Avsic-Zupanc, 2002: Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp. Appl. Acarol.*, **28**,



169-176.

- Radulovic, Z., D. Chochlakis, S. Tomanovic, M. Milutinovic, Y. Tselentis and A. Psaroulaki, 2011: First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**, 111-115.
- Rapti, D. and S. Rehbein, 2010: Seroprevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Albania. *Parasitol. Res.*, **107**, 481-485.
- Rasmussen, K. and A. L. Jensen, 1996: Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Vet. Parasitol.*, **62**, 345-349.
- Samardzic, S., T. Marinkovic, D. Marinkovic, B. Djuricic, E. Ristanovic, T. Simovic, B. Lako, B. Vukov, B. Bozovic and A. Gligic, 2008: Prevalence of antibodies to Rickettsiae in different regions of Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **8**, 219-224.
- Santos, A. S., N. Alexandre, R. Sousa, M. S. Nuncio, F. Bacellar and J. S. Dumler, 2009: Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet. Rec.*, **164**, 168-171.
- Sardelic, S., P. E. Fournier, V. Punda Polic, N. Bradaric, D. Grgic, I. Ivic, D. Ledina, B. Luksic, I. Milas and D. Raoult, 2003: First isolation of *Rickettsia conorii* from human blood in Croatia. *Croat. Med. J.*, **44**, 630-634.
- Schnyder, M., Deplazes, P., 2012. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasit Vectors*, **5**, 258.
- Segura-Porta, F., G. Diestre-Ortin, A. Ortuño-Romero, I. Sanfeliu-Sala, B. Font-Creus, T. Muñoz-Espin, E. de Antonio and J. Casal-Fábrega, 1998: Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur. J. Epidemiol.*, **14**, 395-398.
- Selby, L. A., R. M. Corwin and H. M. Hayes, Jr., 1980: Risk factors associated with canine heartworm infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **176**, 33-35.
- Sibalic, D., 1977: Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in man and in various animals in some areas of Serbia. *Acta Parasitologica Jugoslavica*, **8**, 13-18.
- Silaghi, C., M. Knaus, D. Rapti, I. Kusi, E. Shukullari, D. Hamel, K. Pfister and S. Rehbein, 2014: Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasit. Vectors*, **7**, 62.
- Silva, D. A., J. Lobato, T. W. Mineo and J. R. Mineo, 2007: Evaluation of

- serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, **143**, 234-244.
- Simpson, R. M., S. D. Gaunt, J. A. Hair, K. M. Kocan, W. G. Henk and H. W. Casey, 1991: Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 1537-1541.
- Socolovschi, C., I. Bitam, D. Raoult and P. Parola, 2009: Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, **15 Suppl 2**, 319-321.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, M. Osso, B. Hegarty and E. Breitschwerdt, 2006: A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet. Res.*, **37**, 231-244.
- Stefanovska, J., R. Farkas and R. Kochevski, 2012: Prevalence of some vector borne diseases in dogs in R. Macedonia. In: *Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, pp. 328-329.
- Strauss-Ayali, D., C. L. Jaffe, O. Burshtain, L. Gonen and G. Baneth, 2004: Polymerase Chain Reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.*, **189**, 1729-1733.
- Tasić, A., L. Rossi, S. Tasić, N. Miladinović-Tasić, T. Ilić and S. Dimitrijević, 2008: Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. *Parasitol. Res.*, **103**, 1297-1302.
- Teglas, M., E. Matern, S. Lein, P. Foley, S. M. Mahan and J. Foley, 2005: Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet. Parasitol.*, **131**, 119-127.
- Tennant, K. V., E. N. Barker, Z. Polizopoulou, C. R. Helps and S. Tasker, 2011: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of haemoplasmas in healthy and unhealthy dogs from Central Macedonia, Greece. *J. Small Anim. Pract.*, **52**, 645-649.
- Tesouro, M. A., F. Bacellar, A. Sainz and A. Filipe, 1998: Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **849**, 441-443.
- Tomanovic, S., D. Chochlakis, Z. Radulovic, M. Milutinovic, S. Cakic, D. Mihaljica, Y. Tselentis and A. Psaroulaki, 2013: Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp. Appl. Acarol.*, **59**, 367-376.

- Tsachev, I., E. I. Papadogiannakis, V. Kontos, I. Zarkov, P. V and V. Pelagic, 2006: Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infection among privately-owned dogs in Bulgaria. *J. Hell. Vet. Soc.*, **57**, 212-216.
- Tsachev, I., V. Petrov, G. Flaming and C. Brown, 2008: First detected case of *Anaplasma phagocytophilum* in a dog in Bulgaria. *Rev. Méd. Vét.*, **159**, 562-564.
- Vaclavek, P., K. Sedlak, L. Hurkova, P. Vodrazka, R. Sebesta and B. Koudela, 2007: Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. *Vet. Parasitol.*, **143**, 35-41.
- Velo, E., S. Bino, G. Kuli-Lito, K. Pano, L. Gradoni and M. Maroli, 2003: Recrudescence of visceral leishmaniasis in Albania: retrospective analysis of cases during 1997 to 2001 and results of an entomological survey carried out during 2001 in some districts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **97**, 288-290.
- Velo, E., A. Paparisto, G. Bongiorno, T. Di Muccio, C. Khoury, S. Bino, M. Gramiccia, L. Gradoni and M. Maroli, 2005: Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite*, **12**, 45-49.
- Waner, T., S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary and A. W. C. A. Cornelissen, 2001: Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.*, **95**, 1-15.
- Wang, J. Y., Y. Ha, C. H. Gao, Y. Wang, Y. T. Yang and H. T. Chen, 2011: The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. *Parasit. Vectors*, **4**, 69.
- Wanha, K., R. Edelhofer, C. Gabler-Eduardo and H. Prosl, 2005: Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet. Parasitol.*, **128**, 189-193.
- Watanabe, M., M. Hisasue, K. Hashizaki, M. Furuichi, M. Ogata, S. Hisamatsu, E. Ogi, M. Hasegawa, R. Tsuchiya and T. Yamada, 2003: Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific Polymerase Chain Reaction (SS-PCR). *J. Vet. Med. Sci.*, **65**, 1111-1114.
- Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Kondi, E., Postoli, R., Rinaldi, L., Dimitrova, Z.M.,

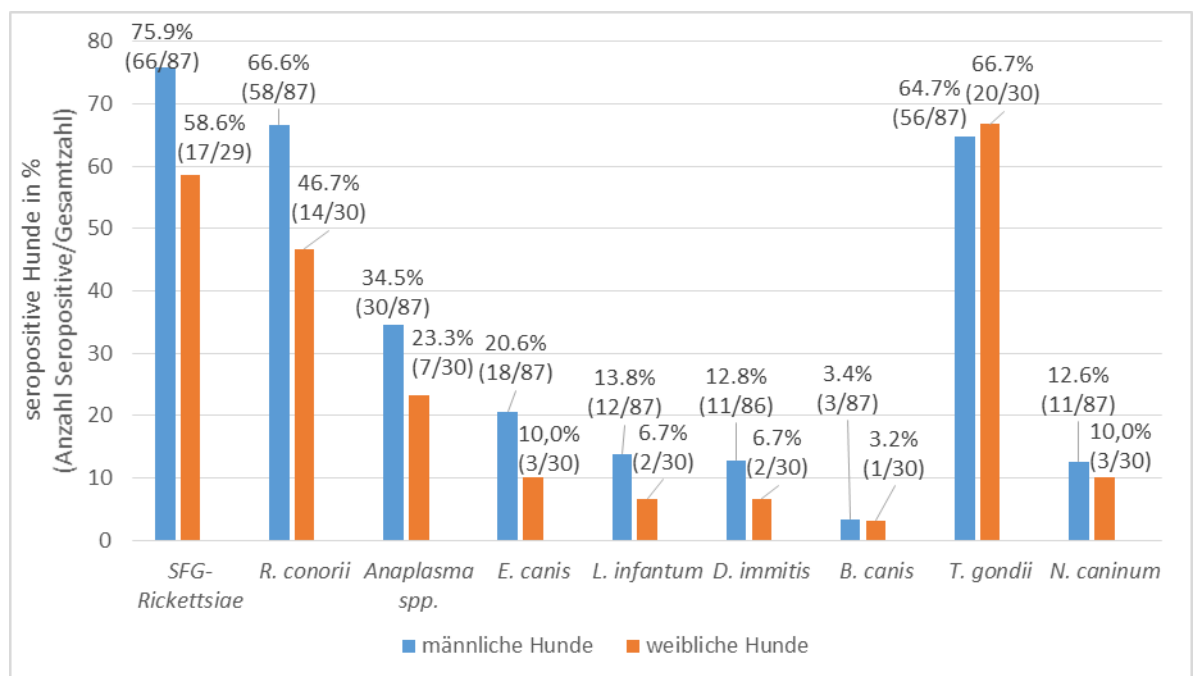
- Visser, M., Knaus, M., Rehbein, S., 2011: Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol. Res.*, **208**, 341-353.
- Xhaxhiu, D., I. Kusi, D. Rapti, M. Visser, M. Knaus, T. Lindner and S. Rehbein, 2009: Ectoparasites of dogs and cats in Albania. *Parasitol. Res.*, **105**, 1577-1587.
- Yamane, I., J. W. Thomford, I. A. Gardner, J. P. Dubey, M. Levy and P. A. Conrad, 1993: Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 1579-1584.
- Yildiz, K., S. Yasa Duru, B. B. Yagci, C. Babur, N. Ocal, S. Gurcan and S. Karaca, 2009: Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Turkiye Parazitol. Derg.*, **33**, 116-119.
- Živičnjak, T., F. Martinkovic and R. Beck, 2007: Canine dirofilariosis in Croatia: Let's face it. *First European Dirofilaria Days, 22-25 Feb 2007, Zagreb, Croatia, Abstr.*, p.35.
- Živičnjak, T., F. Martinković, A. Marinculić, V. Mrljak, N. Kučer, V. Matijatko, Ž. Mihaljević and R. Barić-Rafaj, 2005: A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet. Parasitol.*, **131**, 35-43.

## 2. Weitere Ergebnisse der serologischen Untersuchung

Auch nach zweimaliger Überprüfung blieben *D. immitis*-ELISA-Resultate bei vier Hunden im fraglichen Bereich. Ebenso verhielt es sich bei zwei Hunden bei der Untersuchung auf Antikörper gegen SFG-Rickettsien mittels ELISA. Diese Tiere wurden somit nicht als seropositiv eingestuft.

### 2.1. Seroprävalenzen in den Geschlechtergruppen

Bei den männlichen Hunden waren die Seroprävalenzen bei allen Pathogenen, außer bei *T. gondii*, höher als bei den weiblichen Tieren (Abb.5). Dabei unterschied sich die *N. caninum*- und die *B. canis*-Seroprävalenz mit 12,6% bzw. 3,4% bei männlichen Hunden und 10,0% bzw. 3,2% bei weiblichen Hunden kaum voneinander, während die *E. canis*-, *L. infantum*- und *D. immitis*- Seroprävalenzen bei den männlichen Hunden jeweils ca. doppelt so hoch waren wie bei den weiblichen Hunden ( Abb.5).



**Abb. 5 Seroprävalenzen bei weiblichen und männlichen Polizeihunden aus Albanien**

## 2.2. Auf vektorübertragene Pathogene seronegativ getestete Polizeihunde

Bei 20% der weiblichen Hunde waren weder *D. immitis*-Antigene noch Antikörper gegen vektorübertragene Pathogene nachweisbar, während sich nur 6,7% der männlichen Hunde als seronegativ für diese Pathogene erwiesen (Tab.16). Mit 22,2% wurden deutlich mehr Junghunde seronegativ auf vektorübertragene Pathogene getestet als die adulten (5,2%) und alte Hunde (4,1%) (Tab. 16).

**Tab. 16: Details der seronegativ auf vektorübertragene Pathogene getesteten Polizeihunde aus Albanien**

	Gesamt- anzahl	Seronegativ in % (Anzahl Seronegative)	95% Konfidenz- intervall	Cramer's V	Fisher's-exact- Test	
Hunde insgesamt	117	10,3% (12)	5,4-17,2			
Männliche Hunde	87	6,9% (6)	2,6-14,4	0,19	p=0,7	
Weibliche Hunde	30	20,0% (6)	7,7-38,6			
Junghunde (0-3J)	36	22,2% (8)	10,1-39,1	0,26 <sup>a</sup>	p=0,03*	p=0,02 <sup>a</sup>
Adulte Hunde (>3-7J)	58	5,2% (3)	1,1-14,4	0,02 <sup>b</sup>		p=1 <sup>b</sup>
Alte Hunde (>7-10J)	23	4,3% (1)	0,1-21,9	0,24 <sup>c</sup>		p=0,08 <sup>c</sup>

\*:Vergleich der 3 Altersklassen mit der Freeman-Halton-Erweiterung des Fisher's-exact-Tests

a: Vergleich der Junghunde mit den adulten Hunden

b: Vergleich der adulten Hunde mit den alten Hunden

c: Vergleich der alten Hunde mit den Junghunden

## 2.3. Statistische Auswertung

### 2.3.1. Bivariate Analyse

#### 2.3.1.1. Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und seropositiven Hunden

Cramer's V

Cramer's V-Werte zwischen 0,105 und 0,18 zeigten einen schwachen statistischen Zusammenhang zwischen dem männlichen Geschlecht und dem Vorhandensein von SFG- Rickettsiae-, *R. conorii*-, *Anaplasma* spp.- und *E. canis*-Antikörpern auf (Tab.17). Bei allen anderen Pathogenen hatte das Geschlecht einen sehr geringen Effekt auf den Antikörper- bzw. Antigenstatus der Tiere (Cramer's V= 0,02-0,096) (Tab.17).

### **2.3.1.2. Zusammenhang zwischen der Altersgruppe und seropositiven Hunden**

Cramer's V

Vergleicht man die Junghunde mit den alten Hunden, so konnten bei allen Pathogenen (Cramer's V= 0,24-0,54), außer bei *R. conorii* (Cramer's V=0,02), mittlere bis starke Zusammenhänge zwischen einer höheren Seroprävalenz und einem Alter von über 7 Jahren ausgemacht werden. Das Alter der Hunde hatte auf die SFG-Rickettsiae-Seroaktivität den größten Einfluss (Cramer's V= 0,54) (Tab.17).

### **2.3.1.3. Zusammenhang zwischen seropositiven Hunden und deren Herkunft**

Cramer's V

Die Berechnung des Cramer's V ergab einen mittleren Zusammenhang zwischen der Präsenz von *Anaplasma* spp.-Antikörpern und der Stationierung in Nordalbanien (Cramer's V= 0,204). Des Weiteren ergab sich ein mittlerer Zusammenhang zwischen *D. immitis*-Seroaktivität und der Stationierung der Hunde im Süden (Cramer's V = 0,27). Bei allen anderen Pathogenen waren nur sehr geringe bis schwache Seroprävalenzunterschiede im Gebietsvergleich auszumachen (Cramer's V= 0,01-0,19) (Tab. 17).

### **2.3.1.4. Zusammenhang zwischen dem serologischen Nachweis zweier vektorübertragener Pathogene**

Cramer's V

Der stärkste statistische Zusammenhang war zwischen der *Anaplasma* spp.- und *E. canis*-Seroaktivität auszumachen (Cramer's V= 0,35) (Tab. 18). Zudem bestand ein mittlerer statistischer Zusammenhang zwischen *E. canis*- und *B. canis*- (Cramer's V= 0,28), *B. canis*- und *L. infantum*- (Cramer's V = 0,22) und *R. conorii*- und *Anaplasma* spp.- (Cramer's V = 0,2) seropositiven Tieren (Tab. 18).

### 2.3.1.5. Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Antikörpern gegen die Protozoen *T. gondii*, *N. caninum* und *L. infantum*

Das Auftreten von Antikörpern gegen *N. caninum* und *T. gondii* (Cramer's  $V=0,27$ ) sowie gegen *N. caninum* und *L. infantum* (Cramer's  $V=0,35$ ) zeigte einen mittleren statistischen Zusammenhang. Dieser war für beide Pathogenpaarungen statistisch signifikant ( $p=0,002$ ). Hingegen war ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Präsenz von *T. gondii* und *L. infantum*-Antikörpern nicht auszumachen ( $p=0,13$ , Cramer's  $V=0,16$ ).

**Tab. 17: Stärke des Zusammenhangs zwischen seropositiv getesteten Hunden und deren Geschlecht, deren Alter sowie deren Herkunft im Gruppenvergleich**

Pathogene (Methode)	Geschlecht	Alter			Herkunft		
	Weibliche vs. männliche Hunde	Junghunde vs. Adulte Hunde	Junghunde vs. Alte Hunde	Adulte vs. Alte Hunde	Tirana- vs. Nicht-Tirana Gruppe	Nord- vs. Süd-gruppe	Inland- vs. Küsten-gruppe
SFG-Rickettsiae (ELISA)	$V=0,17$	$V=0,40$	$V=0,54$	$V=0,19$	$V=0,16$	$V=0,10$	$V=0,15$
<i>Rickettsia conorii</i> (IFAT)	$V=0,18$	$V=0,07$	$V=0,02$	$V=0,08$	$V=0,16$	$V=0,17$	$V=0,13$
<i>Anaplasma</i> spp (IFAT)	$V=0,105$	$V=0,27$	$V=0,29$	$V=0,01$	$V=0,02$	$V=0,204$	$V=0,05$
<i>Ehrlichia canis</i> (IFAT)	$V=0,12$	$V=0,00$	$V=0,25$	$V=0,22$	$V=0,13$	$V=0,11$	$V=0,17$
<i>Leishmania infantum</i> (IFAT)	$V=0,096$	$V=0,16$	$V=0,35$	$V=0,17$	$V=0,01$	$V=0,04$	$V=0,13$
<i>Dirofilaria immitis</i> (ELISA)	$V=0,08$	$V=0,18$	$V=0,27$	$V=0,05$	$V=0,15$	$V=0,27$	$V=0,03$
<i>Toxoplasma gondii</i> (IFAT)	$V=0,02$	$V=0,18$	$V=0,45$	$V=0,26$	$V=0,11$	$V=0,19$	$V=0,06$
<i>Neospora caninum</i> (IFAT)	$V=0,036$	$V=0,11$	$V=0,24$	$V=0,12$	$V=0,06$	$V=0,08$	$V=0,01$

$V$ = Cramer's  $V$ ; wenn  $\geq 0,2$  durch Fettdruck hervorgehoben



**Tab. 18: Berechnung des Zusammenhangs zwischen dem serologischen Nachweis zweier vektorübertragener Pathogene mittels Cramer's V**

Vektor- übertragene Pathogene (Methode)	SFG- Rickettsiae (ELISA)	<i>Rickettsia</i> <i>conorii</i> (IFAT)	<i>Anaplasma</i> spp. (IFAT)	<i>Ehrlichia</i> <i>canis</i> (IFAT)	<i>Babesia</i> <i>canis</i> (IFAT)	<i>Leishmania</i> <i>infantum</i> (IFAT)
<i>Anaplasma</i> spp. (IFAT)	Cramers' V 0,18	Cramers' V <b>0,20</b>				
<i>E. canis</i> (IFAT)	Cramers' V 0,19	Cramers' V 0,14	Cramers' V <b>0,35</b>			
<i>B. canis</i> (IFAT)	Cramers' V 0,12	Cramers' V 0,05	Cramers' V 0,07	Cramers' V <b>0,28</b>		
<i>L. infantum</i> (IFAT)	Cramers' V 0,18	Cramers' V 0,02	Cramers' V 0,15	Cramers' V 0,17	Cramers' V <b>0,22</b>	
<i>Dirofilaria</i> <i>immitis</i> (ELISA)	Cramers' V 0,10	Cramers' V 0,11	Cramers' V 0,07	Cramers' V 0,19	Cramers' V 0,08	Cramers' V 0,04

V = Cramer's V, wenn  $\geq 0,2$  durch Fettdruck hervorgehoben

### 2.3.2. Multivariate Analyse (multiple logistische Regression)

Unter Einbezug der Faktoren Geschlecht und Herkunft der Tiere stellt das Alter einen signifikanten Risikofaktor für die Präsenz von SFG-Rickettsiae-, *Anaplasma* spp.-, *L. infantum*- und *T. gondii*-Antikörper sowie für den Nachweis von *D. immitis*-Antigen dar (Tab. 19, 21, 23-25). Ein statistisch signifikanter Einfluss des Alters der Tiere auf den Nachweis von *R. conorii*-, *E. canis*- und *N. caninum*-Antikörpern war durch die multivariate Analyse nicht nachweisbar (Tab. 20, 22, 26). Bei keinem der Pathogene hatte das Geschlecht der Hunde einen signifikanten Effekt auf die Seroprävalenz der Tiere. (Tab. 19-26) Unter Einbeziehung der Faktoren Geschlecht und Alter wiesen Hunde aus Südalbanien, im Vergleich zu Hunden aus Nordalbanien, statistisch signifikant häufiger *D. immitis*-Antigene auf (Tab. 24). Bei keinem der untersuchten Pathogene hatte die Stationierung der Hunde an der Küste einen statistisch signifikanten Effekt auf deren Seroprävalenz (Tab. 19-26).

**Tab. 19: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von Antikörpern gegen SFG-Rickettsiae (ELISA) mittels multipler logistischer Regression**

SFG-Rickettsiae		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	5,62	2,11-15,02
	>= 7 Jahre	31,66	3,74-268,27
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	2,48	0,85-7,24
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	0,51	0,14-1,81
	Tirana	0,47	0,14-1,64
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	2,90	0,58-7,44

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 20: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Rickettsia conorii* -Antikörpern (IFAT) mittels multipler logistischer Regression**

<i>Rickettsia conorii</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	1,45	0,58-3,61
	>= 7 Jahre	0,91	0,30-2,72
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	2,3	0,96-5,52
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	2,4	0,82-6,9
	Tirana	0,49	0,17-1,4
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	0,04	0,14-1,20

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 21: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Anaplasma* spp.- Antikörpern mittels multipler logistischer Regression**

<i>Anaplasma</i> spp.		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	4,23	1,40-12,84
	>= 7 Jahre	3,8	1,05-13,74
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	1,93	0,70-5,3
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	0,35	0,117-1,03
	Tirana	0,80	0,28-2,33
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	1,23	0,42-3,59

Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 22: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Ehrlichia canis*- Antikörpern mittels multipler logistischer Regression**

<i>Ehrlichia canis</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	1,07	0,31-3,67
	>= 7 Jahre	3,33	0,90-12,32
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	2,64	0,67-10,35
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	0,62	0,17-2,25
	Tirana	0,56	0,16-1,92
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	0,18	0,11-1,54

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 23: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Leishmania infantum*- Antikörpern mittels multipler logistischer Regression**

<i>Leishmania infantum</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	4,40	0,51-37,98
	>= 7 Jahre	11,86	1,3-108,11
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	2,07	0,41-10,37
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	0,67	0,15-2,97
	Tirana	1,26	0,24-6,51
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	2,41	0,50-11,48

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 24: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Dirofilaria immitis*-Antigen mittels multipler logistischer Regression**

<i>Dirofilaria immitis.</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	6,27	0,7-56,17
	>= 7 Jahre	11,15	1,04-119,86
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	0,53	0,32-9,44
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	7,07	1,28-39,12
	Tirana	0,73	0,09-5,89
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	0,53	0,13-30,12

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 25: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Toxoplasma gondii*- Antikörpern mittels multipler logistischer Regression**

<i>Toxoplasma gondii.</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	2,23	0,92-5,41
	>= 7 Jahre	12,21	2,43-61,34
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	0,96	0,37-2,46
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	0,42	0,15-1,20
	Tirana	1,4	0,46-4,2
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	1,43	0,51-4,03

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

**Tab. 26: Betrachtung von Einflussfaktoren auf den Nachweis von *Neospora caninum*- Antikörpern mittels multipler logistischer Regression**

<i>Neospora caninum</i>		Odds Ratio	Odds Ratio 95% Konfidenzintervall
Altersklasse	<b>&lt;= 3 Jahre<sup>1</sup></b>		
	3,5-7 Jahre	2,29	0,44-11,87
	>= 7 Jahre	4,92	0,85-11,87
Geschlecht	<b>Weiblich<sup>1</sup></b>		
	Männlich	1,2	0,30-4,8
Herkunft: Nord-Süd-Tirana	<b>Norden<sup>1</sup></b>		
	Süden	1,73	0,42-7,16
	Tirana	0,84	0,17-4,12
Herkunft Küste (+Tirana)-Inland	<b>Küste (+Tirana)<sup>1</sup></b>		
	Inland	0,92	0,23-3,71

<sup>1</sup>Referenzkategorie (= im Fettdruck dargestellt)

## V. DISKUSSION

Bei den Polizeihunden wurden mit den angewandten indirekten Methoden nicht unerhebliche Expositionsraten der in dieser Studie untersuchten Pathogene gefunden. Um einen vorausgegangenen Kontakt mit *N. caninum*, *T. gondii*, *L. infantum*, *B. canis*, *E. canis*, SFG-Rickettsiae oder *Anaplasma* spp. festzustellen, sind serologische Methoden wie der IFAT und der ELISA am weitesten verbreitet und werden am häufigsten angewendet (Allison & Little, 2013; Dubey & Schares, 2011; Harrus & Waner, 2011; Irwin, 2009; Parola et al., 2013; Solano-Gallego et al., 2009; Vercammen et al., 1995). Um die Resultate dieser Studie zu werten, muss bedacht werden, dass allein das Vorhandensein von IgG-Antikörpern in der Regel keine Unterscheidung zwischen einem akuten, chronischen oder vorangegangenen Krankheitsgeschehen zulässt, denn häufig persistieren Antikörper nach überstandener Infektion bei asymptomatischen Tieren (Allison & Little, 2013; Bartsch & Greene, 1996; Brandao et al., 2003; Irwin, 2009). Nur ein 4-facher Anstieg des IgG-Antikörpertiters innerhalb von 1-5 Wochen lässt auf das Vorliegen einer akuten Infektion schließen (Allison & Little, 2013; Carrade et al., 2009; Dubey & Lappin, 2006). Zudem kann das Vorkommen von Kreuzreaktionen die Spezifität des IFATs einschränken (Allison & Little, 2013; Chapman et al., 2006; Harrus & Waner, 2011; Waner et al., 1998). Es gibt keine standardisierten Cut-off Titer, wodurch der Vergleich epidemiologischer Studien erschwert wird. Des Weiteren können Ungenauigkeiten aufgrund der menschlichen Subjektivität beim Ablesen der Fluoreszenzintensität des IFATs bei niedrigen Titerstufen auftreten (Gramiccia, 2011). Zu beachten ist weiterhin, dass in der frühen Phase einer Infektion in der Regel noch keine Antikörper vorhanden sind. In diesem Stadium können im Blut zirkulierende Pathogene besser durch direkte Methoden nachgewiesen werden (Allison & Little, 2013; Baneth, 2011; Baneth et al., 2008; Boozer & Macintire, 2003; Brandao et al., 2003; Oliva et al., 2006). Dabei weist die PCR für den direkten Nachweis von *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. canis*, kaninen haemotrophen Mykoplasmen, *B. canis*, *L. infantum* und *H. canis*, insbesondere im Vergleich zur mikroskopischen Diagnostik, eine hohe Sensitivität und Spezifität auf (Antognoni et al., 2014; Baneth, 2011; Baneth et al., 2008; Carrade et al., 2009; Gaunt et al., 2010; Harrus & Waner, 2011; Karagenc et al., 2006; Willi et al., 2010). Jedoch können bei manchen Protokollen auch eng

verwandte Spezies mitamplifiziert werden, wie beispielsweise *A. phagocytophilum* beim PCR-basierten Nachweis von *A. platys* (Eddlestone et al., 2007; Harvey, 2006). PCR-Protokolle, die als Zielgen *msp2* verwenden, weisen hingegen eine hohe Spezifität für *A. phagocytophilum* auf (Carrade et al., 2009). Die zwei Blutproben der Polizeihunde, die positiv auf *A. platys* getestet wurden, erwiesen sich als negativ in der *A. phagocytophilum*-PCR mit *msp2* als Zielgen. Dies wird als beweisend für die Amplifikation von *A. platys* gewertet. Kurze oder intermittierende Parasitämie kann den Nachweis einer Infektion im Blut mit direkten Methoden erschweren (Allison & Little, 2013; Eddlestone et al., 2007; Egenvall et al., 2000b). Somit kann bei einer chronischen Erkrankung sehr geringes Parasitenaufkommen unter die Nachweisgrenze der PCR sinken (Irwin, 2009; Jefferies et al., 2007; Mylonakis et al., 2003). Insbesondere für die Feststellung von Infektionen mit *T. gondii* und *N. caninum* weist die PCR aufgrund des geringen Parasitenaufkommens im Blut eine geringe Sensitivität auf (Dubey & Lappin, 2006). Zudem sind die Ähnlichkeiten der Gensequenzen, die als Zielgene der PCR dienen, Faktoren, welche die Entwicklung von Protokollen erschweren können. Dies trifft speziell für den Nachweis von SFG-Rickettsiae zu und beeinflusst, neben der oft nur kurz anhaltenden Parasitämie, sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der PCR für diese Bakterien (Allison & Little, 2013; Gaywee et al., 2007). Daher wurde in dieser Studie auf die Durchführung einer PCR-Untersuchung auf *T. gondii*, *N. caninum* und SFG-Rickettsiae verzichtet. Für den Nachweis einer Infektion ist das verwendete Untersuchungsmaterial entscheidend. Im Vergleich zu PCRs aus Blut haben sich beispielweise PCRs aus Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Hautveränderungen und Konjunktivalabstriche als sensibler erwiesen, um *L. infantum*-DNA zu detektieren (Ferreira et al., 2007; Maia et al., 2009; Manna et al., 2008; Strauss-Ayali et al., 2004). Ebenso ist ein Milzaspirat für den Nachweis von *E. canis* besser geeignet als Blut (Harrus et al., 2004). Der Nachteil ist, im Vergleich zur Blutentnahme, die oftmals invasivere Gewinnung solcher Proben. Letztlich kann auch durch ein negatives PCR-Ergebnis eine bestehende Infektion nicht ausgeschlossen werden. Folglich verbessert eine Kombination aus direkten und indirekten Methoden, wie sie in dieser Studie für den Nachweis der meisten Pathogene gewählt wurde, die Aussagekraft der Untersuchungen, wobei bei der Auswertung der Ergebnisse die oben erwähnten Einschränkungen zu bedenken sind (Allison & Little, 2013; Baneth et al., 2008; Irwin, 2009). Auf entsprechende pathogenspezifische Besonderheiten wird im

Folgenden weiter eingegangen.

### **SFG-Rickettsiae**

Die in dieser Arbeit untersuchten Polizeihunde zeigten hohe Expositionsraten in Bezug auf SFG-Rickettsien (61,5% (IFAT) bzw. 71,5% (ELISA)). Dies lässt vermuten dass viele albanische Hunde mit diesen Bakterien in Kontakt kommen. Zudem wurden bei 40 von 136 untersuchten albanischen Zecken SFG-Rickettsiae mittels PCR nachgewiesen (Christova et al., 2003). Die Infektionsrate von *Rh. sanguineus* mit *R. conorii* lag in der genannten Studie bei 11%, während bei einer Veröffentlichung aus dem Nachbarland Kosovo in 4 von 8 der dort untersuchten *Rh. sanguineus*-Zecken PCR-Produkte dieses Bakteriums erfasst wurden (Christova et al., 2003; Fournier et al., 2003; Parola et al., 2013). Die hohe Präsenz von *R. conorii* in *Rh. sanguineus* und die hohen Befallsraten der albanischen Hunde mit dieser Zeckenart (Xhaxhiu et al., 2009) unterstützen die These eines hohen Infektionsrisikos albanischer Hunde mit diesem Pathogen. Mit der vorliegenden Studie vergleichbare SFG-Rickettsiae-Seroprävalenzzahlen von 52%-72% wurden aus Kroatien (Punda-Polić et al., 1995), Griechenland (Mylonakis et al., 2004) und Italien (Pennisi et al., 2012) veröffentlicht. Aufgrund serologischer Kreuzreaktionen innerhalb der Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe ist anhand der in dieser Studie nachgewiesenen Antikörper kein Rückschluss auf die ursächliche Rickettsienart möglich (Allison & Little, 2013; Breitschwerdt et al., 1988; Brouqui et al., 2004). Somit ist es denkbar, dass andere SFG-Rickettsiae für die Höhe der hier festgestellten *R. conorii*- Seroprävalenz mitverantwortlich sind. Allerdings wurden in Europa im Blut natürlich infizierter Hunde bisher nur der *R. conorii malish* und *R. conorii israelensis* mittels PCR identifiziert (Alexandre et al., 2011; Solano-Gallego et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2008a).

Da *Rh. sanguineus* mediterrane Klimazonen bevorzugt und dementsprechend in Albanien auch primär in den mediterranen Küstengebieten gefunden wurde (Christova et al., 2003; Gina et al., 1975; Luli, 1963), wäre zu erwarten, dass die *R. conorii*- Prävalenz der dortigen Polizeihunde höher ist, als bei Tieren aus den östlich gelegenen Bergregionen mit kontinentalem Klima. So wurde in Kroatien eine deutlich höhere *R. conorii*-Seroprävalenz bei Hunden aus der mediterranen Küstenregion als bei Hunden aus der nördlich gelegenen Hauptstadt Zagreb mit kontinentalem Klima nachgewiesen (Punda-Polić et al., 1995). In der vorliegenden Studie gab es jedoch hinsichtlich der geographischen Verbreitung *R. conorii*-

seropositiver Hunde nur schwache regionale Differenzen, die nicht statistisch signifikant waren. Eine relativ geringe Probenzahl kann zwar signifikante Unterschiede verbergen und zu einer Verzerrung hinsichtlich der tatsächlichen Prävalenz der regionalen Hundepopulation führen, aber dies erklärt nicht die hohe *R. conorii*-Seroprävalenz der Polizeihunde von >50% in allen Gebietsgruppen. Diese Antikörper sind somit wahrscheinlich auch auf andere *Rickettsia*-Arten der Zeckenbissfiebergruppe, wie beispielsweise *R. helvetica* oder *R. monacensis*, zurückzuführen, die in *I. ricinus*, einer Zeckenart, welche kontinentalem Klima zugeneigt ist, gefunden wurden (siehe Kapitel 1.1.). Weiterhin könnten Infektionen, die während der Ausbildungszeit in Tirana erfolgt sind, zu persistierenden Antikörpertitern geführt haben. So wurde eine Persistenz von *R. conorii*-Antikörpern von wenigen Monaten bis zu 2 Jahren beobachtet (Espejo et al., 1993; Tesouro et al., 1998).

Polizeihunde stehen in engem Kontakt zum Menschen und sind gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt. Dabei ist zu beachten, dass Hundebesitzer einem höheren MSF-Infektionsrisiko ausgesetzt zu sein scheinen, wahrscheinlich durch den möglichen Transport der Zecken durch Hunde zum Menschen (Mumcuoglu et al., 1993; Ortuño et al., 2009). Obwohl *Rh. sanguineus* Hunde als Wirt bevorzugt, sind aus Albaniens Nachbarländern Bosnien-Herzegowina und dem Kosovo Berichte veröffentlicht, laut denen diese Zecke auch bei Menschen parasitiert (Fournier et al., 2003; Omeragic, 2011). Die hohe Anzahl seropositiver Polizeihunde aus Albanien, die acht in Südosteuropa detektierten humanpathogenen SFG-Rickettsiae (Tab. 2, Seite 9) und die Korrelation zwischen MSF-Erkrankungen bei Menschen und der Prävalenz von *R. conorii*-Antikörpern bei Hunden (Herrero-Herrero et al., 1989; Herrero et al., 1992; Levin et al., 2012) zeigen die Notwendigkeit zu weiteren Studien auf. Zum einen gilt es, die verantwortlichen Rickettsienarten für die Antikörperbildung der Hunde in Albanien zu finden und deren zoonotisches Potential zu evaluieren. Zum anderen sollte untersucht werden, ob Hunde, außer für *R. conorii* (Levin et al., 2012), auch als Reservoir für andere Rickettsienarten in Frage kommen.

### ***Anaplasma* spp.**

Die PCR-Resultate der Blutproben der albanischen Polizeihunde zeigen die Präsenz von *A. platys* in Albanien und bestätigen somit die Ergebnisse von Hamel et al. (Hamel et al., 2013). Zudem wurde *A. platys* in Südosteuropa bereits im Blut von



Hunden aus Griechenland, Kroatien und Rumänien molekularbiologisch nachgewiesen (Andersson et al., 2013; Dyachenko et al., 2012; Kontos et al., 1991). Auch wenn bei keinem der albanischen Polizeihunde dieser Untersuchung *A. phagocytophilum*-DNA nachweisbar war, stellten Hamel et al. fest, dass dieses Bakterium bei Hunden aus der Region durchaus vorkommt (Hamel et al., 2015). Zudem wurde *A. phagocytophilum*-DNA bei 2,2% von 138 untersuchten rumänischen Hunden (Hamel et al., 2012) und bei einem Hund aus Bulgarien (Tsachev et al., 2008b) festgestellt. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung bei nur zwei Polizeihunden ein direkter DNA-Nachweis gelang, spricht die hohe *Anaplasma* spp.-Seroprävalenz von 31,6%, die bei diesen Hunden festgestellt wurde, für ein hohes Expositionsrisiko. Ähnliche Seroprävalenzzahlen von 24% und 40% wurden bei Privat- bzw. Straßenhunden aus Tirana gefunden, wobei der direkte Nachweis von *Anaplasma* spp. in diesen Studien bei 4,3% der Privattiere, doch bei keinem der Straßenhunde gelang (Hamel et al., 2015; Hamel et al., 2009). Die Seroprävalenzen bei Hunden aus anderen südosteuropäischen Ländern reichen von 3,4-46,1% (Hamel et al., 2012; Mircean et al., 2012; Pantchev et al., 2015; Pavlovic et al., 2012a; Stefanovska et al., 2012). Damit liegt das Ergebnis bei den Polizeihunden aus Albanien vergleichsweise hoch. Die Aussagekraft solcher Vergleiche wird jedoch durch die Anwendung verschiedener serologischer Methoden und das Fehlen eines standardisierten Cut-off-Titers reduziert. Das Auftreten von serologischen Kreuzreaktionen bei *A. platys*- und *A. phagocytophilum*- Infektionen ist beschrieben (Santos et al., 2009). Somit können beide Spezies für die positiven IFAT Resultate verantwortlich sein. Zudem sind, insbesondere bei niedrigen Titerstufen, auch Kreuzreaktionen zwischen *A. phagocytophilum* und *E. canis* möglich (Breitschwerdt et al., 1998; Waner et al., 2001). Folglich ist es denkbar, dass die tatsächliche *Anaplasma* spp.- Prävalenz etwas geringer ist als die hier ermittelten 31,6%.

Verglichen mit den Hunden aus Südalbanien wiesen zwar fast doppelt so viele Hunde aus dem Norden Albaniens *Anaplasma* spp.-Antikörper auf und die Herkunft aus Südalbanien hatte laut der Berechnung des Cramer's V einen mittleren Effekt auf die Seroprävalenz der Tiere. Allerdings war diese Differenz weder in der bi- noch in der multivarianten Analyse statistisch signifikant. Somit wird dem geographischen Zusammenhang keine grosse Bedeutung zugemessen. Auch signifikante Unterschiede zwischen der Seroprävalenz der Hunde aus der

mediterranen Küstenregion im Westen und der Seroprävalenz der Hunde aus der Berglandschaft im Osten waren nicht ersichtlich. Ähnliche Beobachtungen wurden aus Rumänien veröffentlicht. Wie Albanien weist auch Rumänien kontinentale und mediterrane Klimazonen auf und ist durch hohe Gebirgszüge und Tiefebene geprägt. Trotz dieser klimatischen und geographischen Unterschiede und obwohl die Vektorzecken unterschiedliche Klimazonen bevorzugen, konnten dort in einer groß angelegten Studie ebenfalls keine relevante Korrelation zwischen der *Anaplasma* spp.-Seroprävalenz und der Herkunft der Hunde festgestellt werden (Mircean et al., 2012). Eine Erklärung hierfür ist, dass, mögliche regionale Unterschiede im Vorkommen der Anaplasmaarten durch die bestehende serologische Kreuzreaktivität verschleiert werden.

Fälle humaner granulozytärer Anaplasmosen in der albanischen Bevölkerung sind bisher nicht beschrieben. Jedoch existieren Fallberichte aus Griechenland (Psaroulaki et al., 2008), Kroatien (Misić-Majerus et al., 2000) und Slowenien (Lotric-Furlan et al., 2003). Da Hunde als Indikator für eine mögliche Infektionsgefahr des Menschen dienen können (Carrade et al., 2009) und *A. phagocytophilum* bei albanischen Hunden nachgewiesen wurde (Hamel et al., 2013), ist die hohe Expositionsrate der Polizeihunde im Hinblick auf das Zoonosepotential von *A. phagocytophilum* zu beachten, auch wenn einschränkend zu bedenken ist, dass die Antikörper auch auf *A. platys*-Infektionen zurückgeführt werden können.

### ***Ehrlichia canis***

Im Jahr 2009 wurden in Albanien bei 15 von 30 untersuchten Straßenhunden *E. canis*-Antikörper festgestellt (Hamel et al., 2009) und mit 50% eine der höchsten Seroprävalenzzahlen Europas veröffentlicht (Sainz et al., 2015; Trotz-William & Trees, 2003). Im Vergleich dazu wiesen mit nur 17,9% deutlich weniger Polizeihunde eine *E. canis*- Seroaktivität auf. Damit ist dieses Ergebnis eher mit der Seroprävalenz von 20,8% vergleichbar, die bei Privathunden aus Tirana festgestellt wurde (Hamel et al., 2015). Eine Reduktion des Infektionsrisikos aufgrund der Anwendung von Zeckenprophylaxe und menschlicher Pflege ist somit anzunehmen. Anhand der verfügbaren Daten sind jedoch nur spekulative Aussagen möglich und weitere Studien nötig, um diese Tendenz zu verifizieren. Für diese These spricht allerdings auch eine Studie aus Spanien, in der 54,7% der untersuchten Straßenhunde *E. canis*- Antikörper aufwiesen, während Privattiere nur

zu 3,1% seropositiv waren (Amusategui et al., 2008). Veröffentlichungen zur *E. canis*-Seroprävalenz bei Hunden aus Albaniens Nachbarländern Griechenland und Mazedonien sind mit den Ergebnissen der Studien aus Albanien vergleichbar. So wurde in Griechenland für die dort untersuchten Straßen- und Tierheimhunde eine Seroprävalenz von 41,2% (63/153) (Jensen et al., 2003) erhoben, während in Mazedonien 18,7% (27/144) der getesteten Hunde seropositiv waren, wobei die Herkunft der Hunde bei dieser Studie nicht angegeben wurde (Stefanovska et al., 2012).

Bei keinem der untersuchten Polizeihunde gelang der direkte Nachweis von *E. canis*, was daran liegen kann, dass asymptomatische Hunde untersucht wurden. Antikörper können nach Überstehen der akuten Phase bei subklinischen Tieren persistieren, während die Bakterien selbst nicht mehr direkt nachweisbar sind (Neer & Harrus, 2006). So wurden auch bei Straßenhunden aus Albanien bei 50% Antikörper, aber nur bei 17% *E. canis* mittels PCR detektiert (Hamel et al., 2009).

Die untersuchten Polizeihunde aus Albanien waren bis auf wenige Ausnahmen (drei Labradore) Deutsche Schäferhunde. Diese Rasse gilt für einen schweren Krankheitsverlauf bei einer *E. canis*-Infektion als genetisch prädisponiert (Harrus et al., 1997b; Nyindo et al., 1980; van Heerden, 1982). Dies unterstreicht die Bedeutung von *E. canis* und die Notwendigkeit effektiver Zeckenprävention insbesondere bei der Polizeihundearbeit.

### **Kanine haemotrophe Mykoplasmen**

Bei keinem der untersuchten Polizeihunde gelang der DNA-Nachweis von kaninen haemotrophen Mykoplasmen. Im Gegensatz dazu wurden sie in Rumänien bei 12,3% (17/138) und in Griechenland bei 10,6% (15/142) der untersuchten Hunde gefunden. Allerdings wurden in die rumänische Studie hauptsächlich Straßenhunde eingeschlossen und 133 der 142 untersuchten griechischen Hunde als klinisch krank eingestuft (Hamel et al., 2012; Tennant et al., 2011). Schlechter Hygienestatus der Hunde und ein geschwächtes Immunsystem können eine Infektion mit haemotrophen Mykoplasmen begünstigen (Novacco et al., 2010; Willi et al., 2010). Somit kann der gute Pflege- und Gesundheitsstatus der Polizeihunde ein Grund für den negativen Befund sein. Dass diese Pathogene in Albanien, zumindest in der mediterranen Region, durchaus eine Rolle spielen, zeigten Hamel et al. durch den Nachweis kaniner haemotropher Mykoplasmen bei Hunden aus Tirana (Hamel et

al., 2015).

### ***Leishmania infantum***

Die mit direkten und indirekten Methoden bestimmte Prävalenzzahl der Polizeihunde lag bei 12%. Im Vergleich zu anderen Publikationen aus Albanien, mit Seroprävalenzen von 0% bis 15,9%, liegt dieses Ergebnis im oberen Bereich. Da in diesen Studien nicht angegeben wurde, ob die Tiere regelmäßig eine Sandmücken- oder Zeckenpräventionsmaßnahme erhalten hatten und in die meisten Studien auch symptomatische Tiere mit einbezogen wurden (Bizgha et al., 2013; Cricko et al., 1999; Hamel et al., 2015; Hamel et al., 2009; Lazri et al., 2008), ist die Seroprävalenz der Polizeihunde als vergleichsweise hoch einzustufen. Die oben genannten Studien unterschieden sich hinsichtlich Sammelzeitraum, der angewandten serologischen Methoden und der Cut-off-Titer sowie der Haltungsform der Tiere und der Probenanzahl, was die Aussagekraft solcher Vergleiche einschränkt. Dennoch geben die genannten Zahlen dazu Anlass, die *L. infantum*-Präventionsmaßnahmen an den Polizeihunde zu überdenken und zu verbessern. Zumal aus Albanien, nach Italien, in den Jahren 2005-2010 mit 461 die meisten Fälle humaner viszeraler Leishmaniose in Europa gemeldet wurden (GHO, 2014). Inzwischen sind Fälle aus fast jedem Qark in Albanien beschrieben (Adhami et al., 1983; Bino, 2010; Kero & Xinxo, 1998; Velo et al., 2003). Dabei nahm die Zahl der dokumentierten Fälle in den letzten 30 Jahren zu (Bino, 2010; Velo et al., 2003). Unter anderem wird eine steigende Infektionsrate in der Hundepopulation für diese Zunahme verantwortlich gemacht (Velo et al., 2003). Vorangegangene Studien über die kanine Leishmaniose in Albanien konzentrierten sich meist auf Hunde aus Tirana und der Küstenregion, doch inzwischen sind auch Untersuchungen von Hunden aus anderen Distrikten veröffentlicht. So konnten bisher *L. infantum*-Antikörper bei Hunden aus Tirana, Durrës, Shkodra, Lezha, Fier, Elbasan, Vlora, Gjirokastrë, und Korçë nachgewiesen werden (Bizgha et al., 2013; Cani et al., 2001). Dass *L. infantum* in diesen Regionen endemisch ist, konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden und zudem wurden erstmals *Leishmania*-Antikörper bei Hunden aus Kukës und Dibiër nachgewiesen. Bei einem Hund aus Dibiër war zudem der Direktnachweis des Parasiten mittels PCR möglich. Entomologische Untersuchungen zur Sandmückenpopulation zeigten die Präsenz der Vektoren in Gjirokastrë und der Küstenregion, allerdings fehlen bislang landesweite Studien (Adhami et al., 1983; Bizgha et al., 2013; Velo et al., 2003;

Velo et al., 2005). Obwohl in den mediterranen Küstenregionen günstigere klimatische Bedingungen für die Vektoren vorherrschen, ergaben die Ergebnisse der vorliegenden Studie keine Tendenz zu einem höheren Infektionsrisiko in dieser Region. Im Inland waren sogar doppelt so viele Hunde mit diesen Protozoen in Kontakt gekommen wie an der Küste. Allerdings wurden alle Hunde in Tirana ausgebildet. Aufgrund des oft asymptomatischen und/oder langsamen Krankheitsverlaufes kann eine Ansteckung unbemerkt bereits dort stattgefunden haben. Keines der *L. infantum*-positiv getesteten Tiere in dieser Studie zeigte klinische Symptome. Dies wird bei Hunden in endemischen Gebieten häufig beobachtet (Baneth et al., 2008).

Besonders bei Hunden mit klinischen Symptomen hat der IFAT eine hohe Sensitivität und Spezifität (Maia & Campino, 2008). Da *Trypanosoma cruzi* und andere *Leishmania*-Arten in Albanien so gut wie keine Rolle spielen, kann man eine Reduktion der Spezifität dieser Methode aufgrund von Kreuzreaktionen als gering einstufen. Mettler et al. zeigte, dass bei ELISA-basierten *L. infantum*-Diagnostikmethoden Kreuzreaktionen mit *B. canis*, *T. gondii*, *N. caninum* und *H. canis* möglich sind, befand den IFAT jedoch als 100% spezifisch (Mettler et al., 2005). Dahingegen konnten andere Publikationen, bei Verwendung der IFAT-Methode mit einem Cut-off-Titer von 1:40, das Vorkommen von Kreuzreaktionen mit *E. canis* (Ferreira et al., 2007) und *T. gondii* bei geringen Titerstufen nicht ausschließen (Zanette et al., 2014). Die statistische Auswertung der serologischen Ergebnisse ergab in der vorliegenden Studie keine relevanten Zusammenhänge zwischen *L. infantum* und *E. canis* und in Übereinstimmung mit einer Arbeit aus Spanien konnten wir ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *T. gondii*- und *L. infantum*-Antikörpern feststellen (Cabezón et al., 2010). Bei der Untersuchung von klinisch gesunden Hunden, wie es bei unserer Studie der Fall war, muss davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität des IFATs reduziert ist (Mettler et al., 2005). Zudem kann es teilweise Monate bis Jahre dauern, bis Antikörper nach einer Infektion nachweisbar sind (Oliva et al., 2006). Um auch infizierte Tiere ohne Antikörperbildung zu erfassen, wurden die Blutproben der Polizeihunde auch molekularbiologisch untersucht. Dabei konnte bei einem Viertel der *L. infantum*-seropositiven Tiere die Infektion mittels PCR nachgewiesen werden und ein PCR-positiver Hund war seronegativ. Einige Publikationen erfassten bei Untersuchungen von Blutproben ebenfalls mehr *L.*

*infantum*-positive Tiere mit serologischen als mit molekularen Methoden (Hamel et al., 2012; Lazri et al., 2008). Andere Autoren befanden wiederum die PCR als die sensitivere Methode (Chargui et al., 2009; Wang et al., 2011). Dabei haben sich insbesondere Protokolle, die als Zielgen die Kinetoplasten-DNA verwendeten, als sehr sensitiv erwiesen und wurden daher in unserer Studie eingesetzt (Lachaud et al., 2002). Allerdings erwiesen sich, wie schon erwähnt, PCR-Untersuchungen aus der Haut, Lymphknoten, Knochenmark oder Konjunktivalabstrichen sensitiver als aus Blutproben (Ferreira et al., 2007; Maia et al., 2009; Manna et al., 2008; Strauss-Ayali et al., 2004). Da bei subklinisch infizierten Tieren eine Infektion nicht immer im Blut nachweisbar ist, kann die tatsächliche Infektionsrate der albanischen Polizeihunde höher liegen als die hier ermittelten 12%.

Obwohl Hunde als Hauptreservoir für *L. infantum* gelten (Dantas-Torres, 2007), scheint das Ansteckungsrisiko für Besitzer eines *Leishmania*-positiven Hundes in einem endemischen Gebiet nicht erhöht zu sein (Solano-Gallego et al., 2009). Nur eine Studie aus dem Iran konnte bisher ein erhöhtes Infektionsrisiko für Halter *Leishmania*-positiver Hunde zeigen (Gavgani et al., 2002b). Dennoch ist die steigende Zahl der diagnostizierten humanen Krankheitsfälle in Albanien besorgniserregend und es gilt, Hunde so gut wie möglich vor einer Infektion zu schützen und eine Übertragung von Leishmanien auf Sandmücken zu verhindern. Systematische Präventionsprogramme sollten speziell bei Polizeihunden, die unter staatlicher Kontrolle stehen, leichter durchführbar und umsetzbar sein als bei Straßenhunden oder Tieren in Privathand. Besonders bei Polizeihunden und Hunden, die eng mit dem Menschen zusammenleben und arbeiten ist die regelmäßige Anwendung von Produkten, die auf einen langzeitlichen Schutz vor Sandmücken geprüft wurden, zu empfehlen, da diese nachweislich die Infektionsgefahr für Mensch und Hund reduzieren (Gavgani et al., 2002a; Halbig et al., 2000; Killick-Kendrick et al., 1997; Maroli et al., 2001; Otranto et al., 2007).

### ***Dirofilaria immitis***

Höhere Temperaturen aufgrund des Klimawandels werden als ein Grund genannt, warum steigende Infektionsraten mit *D. immitis* bei Hund und Mensch beobachtet werden (Morchón et al., 2012; Simón et al., 2012). Bisher durchgeführte epidemiologische Studien aus südosteuropäischen Ländern lassen auf eine weite Verbreitung des Parasiten schließen, wobei teilweise steigende Prävalenzzahlen beobachtet wurden (siehe Kapitel 7.3.) (Tasic-Otasevic et al., 2015).

Die Prävalenz von 11,2% bei den Polizeihunden in Albanien ist mit früheren Studien aus Albanien vergleichbar (Hamel et al., 2009; Lazri et al., 2008; Rapti & Rehbein, 2010). In anderen südosteuropäischen Ländern reicht die *D. immitis*-Infektionsrate von einigen sporadischen Fällen bis hin zu hyperendemischen Foki mit bis zu 41% (Florea et al., 2014; Mircean et al., 2012; Tasic-Otasevic et al., 2015; Živičnjak et al., 2007) .

Der ELISA DIROchek® gilt im Vergleich zu der Detektion von Mikrofilarien als die sensitivere Methode (American Heartworm Society, 2005; Genchi et al., 2007; Simón et al., 2012). Ihm wird eine hohe Spezifität (71-96,2%) und eine hohe Sensitivität (84,6-95,9%) bei der Erfassung von *D. immitis*-Antigenen zugesprochen (Atwell et al., 1988; Brunner et al., 1988; Courtney & Zeng, 2001). Dennoch können Kreuzreaktionen mit dem Lungenwurm *Angiostrongylus vasorum* vorkommen (Schnyder & Deplazes, 2012). Zudem kann bei sehr geringen Befallszahlen mit *D. immitis* die Sensitivität reduziert sein (Courtney & Zeng, 2001). Infektionen mit nur männlichen Würmern werden nicht erfasst und Antigene sind in der Regel erst 5-8 Monate nach der Infektion nachweisbar, wodurch sich eine diagnostische Lücke ergibt (Genchi et al., 2007; Nelson et al., 2005). Die tatsächliche Infektionsrate der Polizeihunde könnte daher über der erfassten Seroprävalenz von 11,2% liegen.

Basierend auf Umgebungstemperaturen und der davon abhängigen Entwicklung der infektiösen L3 im Vektor berechneten Genchi et al. für die Küstenregionen Albaniens, mit einer möglichen jährlichen Entwicklung von 5-10 Larvengenerationen in den Mücken, ein höheres Infektionsrisiko als im Inland mit 1-5 Generationen pro Jahr (Genchi et al., 2005). Dies konnten die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Die Seroprävalenz der Tiere aus der Küstenregion und aus dem Inland unterschieden sich nicht statistisch signifikant. Stattdessen wurde für Hunde aus Südalbanien im Vergleich zu Hunden aus Nordalbanien eine statistisch signifikant höhere Infektionsrate festgestellt. Dabei wiesen die Hunde aus Südalbanien eine 5,6-fach erhöhte Chance auf, *D. immitis*-positiv zu sein. Auch unter Einbezug der Faktoren Alter und Geschlecht in die logistische Regression wurde die Stationierung im Süden des Landes als signifikanter Risikofaktor identifiziert, was in unterschiedlichen klimatischen Bedingungen begründet sein kann. Auch Rapti und Rehbein registrierten bei Hunden aus der südlichen Küstenregion Vlora eine vergleichsweise hohe

Seroprävalenz von 30%, während bei nur 5-7,5% der Hunde aus den nördlichen Küstenregionen Lezha und Skodra *D. immitis*- Antigene nachgewiesen wurden (Rapti & Rehbein, 2010). Dabei liegt die Jahresdurchschnittstemperatur von Vlora ein Grad über der von Lezha (climate-data.org, 2015). Doch Aussagen zu grundsätzlichen klimatischen Unterschieden von Nordalbanien im Vergleich zu Südalbanien sind schwierig, da das Klima innerhalb dieser Regionen aufgrund der hohen Gebirgskzüge im Inland sehr variabel ist. Dennoch wird die oben beschriebene Tendenz durch weitere Studien unterstützt. So wiesen Hunde aus der griechischen Provinz Ioannina, die im Süden an Albanien grenzt, eine Seroprävalenz von 21,3% auf (Athanasίου et al., 2012), wohingegen im nördlich von Albanien gelegenen Kroatien bisher nur sporadische Fälle von *D. immitis* beschrieben sind (Živičnjak et al., 2007). Auch in einigen anderen europäischen Ländern unterscheidet sich innerhalb der jeweiligen Landesgrenzen die Ansteckungsgefahr für Hunde vom Norden zum Süden und von Region zu Region teilweise deutlich (Diakou & Kapantaidakis, 2014; Mircean et al., 2012; Morchón et al., 2012; Otranto et al., 2009a). Letztlich zeigt jedoch das weite Odds Ratio 95% Konfidenzintervall, dass der ermittelte Einfluss, den die Stationierung der Polizeihunde im Süden auf deren Seroprävalenz hat, einer sehr großen Varianz unterliegt.

Infizierte Hunde stellen aufgrund des chronischen Krankheitsverlaufes oft ein klinisch asymptomatisches Reservoir dar (Simón et al., 2012). Zwar sind bisher keine Fälle von *D. immitis*-Infektionen bei Menschen aus Albanien, wohl aber aus Kroatien dokumentiert (Pozgain et al., 2014). Zwischen der Expositionsrate des Menschen und der Prävalenz der Hunde besteht ein Zusammenhang, der im Hinblick auf zoonotisches Potential auch in Albanien zu beachten ist (Montoya-Alonso et al., 2011). Auf Gran Canaria wurde ein Seroprävalenzzrückgang bei Hunden beobachtet, der vermutlich auf den systematischen Einsatz von Herzwurmprophylaxe zurückzuführen ist (Montoya-Alonso et al., 2011; Montoya et al., 2006). Solche Maßnahmen sollten beispielsweise auch in Albanien erwogen werden.

### ***Babesia* spp.**

Bei keinem der in der vorliegenden Studie untersuchten Hunde wurde *Babesia* spp.-DNA nachgewiesen. Jedoch zeigt der direkte Nachweis von *Babesia* spp. bei 7 von 30 untersuchten Straßenhunden und bei 2 von 602 untersuchten Privathunden aus



Tirana das Vorkommen dieser Parasiten in Albanien. (Hamel et al., 2015; Hamel et al., 2009). In den wenigen auf PCR-Untersuchungen basierenden Studien zum Vorkommen von *Babesia* spp. bei klinisch gesunden Hunden aus Südosteuropa lagen die Befallsraten bei 3,4%- 45% (Kapitel 6.4., Tab. 8). Die hohen Infektionsraten in diesen Publikationen betrafen Straßen- und Tierheimhunde. Der negative Befund der Polizeihunde könnte auf eine effektivere Zeckenprävention zurückzuführen sein. Dennoch zeigt der Nachweis von *Babesia* spp.- Antikörpern bei 3,4% der Tiere, dass Kontakt zu diesen Parasiten bestand. Allerdings kann anhand der Daten der vorliegenden Studie die von Hornok et al. aufgestellte These, der deutsche Schäferhund sei für eine chronische (subklinische) Babesiose mit langer Antikörperpersistenz prädisponiert, nicht bestätigt werden (Hornok et al., 2006). Schließlich war die Seroprävalenz der Polizeihunde die serologisch auf *Babesia canis*-Antikörper untersucht wurden, bestehend aus 114 Deutschen Schäferhunden und drei Labradoren, geringer als in anderen Studien aus Südosteuropa. Da in Albanien bisher sowohl *B. canis* als auch *B. vogeli* als endemisch gelten und das Vorkommen von Kreuzreaktionen innerhalb der Gattung *Babesia* spp. bekannt ist, ist anhand der Antikörper kein sicherer Rückschluss auf die zugrundeliegende Babesienart möglich (Hamel et al., 2009; Papadopoulos et al., 1996; Yamane et al., 1993). Zudem wurden in Kroatien und Rumänien bei einigen wenigen Hunden auch *B. gibsoni*, *B. felis*-like und *B. caballi*, *Theileria equi* und *Theileria annae* (= *B. vulpes* sp. nov) detektiert (Baneth et al., 2015; Beck et al., 2009; Hamel et al., 2012).

### ***Hepatozoon canis***

Aus Südosteuropa liegen zwar Fallberichte von *H. canis*-Infektionen bei Hunden aus Griechenland (Kontos & Koutinas, 1990; Mylonakis et al., 2005) und Bulgarien (Tsachev et al., 2008a) vor, aber aus Feldstudien hervorgehende Prävalenzangaben sind aus dieser Region kaum verfügbar. In Kroatien waren 11,8% der untersuchten Hunde PCR-positiv (Vojta et al., 2009). Aufgrund der mit direkten Methoden ermittelten Prävalenzzahlen bei Straßenhunden von 17% (5/30) und 52,8% (19/36), ist von einer starken Präsenz dieser Parasiten in Albanien auszugehen (Hamel et al., 2009; Lazri et al., 2008). Im Vergleich dazu waren jedoch in Albanien mit 1% deutlich weniger Hunde unter veterinärmedizinischer Kontrolle mit *H. canis* infiziert (Hamel et al., 2015). Dies ist mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie vergleichbar, denn *H. canis* konnte bei den Polizeihunden nicht nachgewiesen

werden. Da eine Infektion durch die orale Aufnahme der Vektorzecke bei der Fellpflege oder durch die Aufnahme von mit Zecken investiertem Aas oder Beutetieren erfolgt (Baneth, 2006a; Vojta et al., 2009), ist es naheliegend, dass Hunde, die von Menschen gepflegt und versorgt werden, diesen Infektionsquellen weniger ausgesetzt sind als Straßenhunde. Zum anderen kann die bei den Polizeihunden angewandte Zeckenprophylaxe zu einer Reduktion des Infektionsrisikos geführt haben. Allerdings schließt eine nicht nachweisbare Parasitämie eine bestehende *H. canis*-Infektion nicht aus, da diese Parasiten in Gewebszysten persistieren können, ohne dass Gamonten im Blut auffindbar sind (Baneth & Weigler, 1997; Eiras et al., 2007; Murata et al., 1993b).

### ***Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* ist unter anderem wegen seiner Humanpathogenität weltweit von Bedeutung (Dubey, 2010). Zwar finden die geschlechtliche Vermehrung und somit auch die Oozystenausscheidung nur bei Feliden statt, dennoch besteht die Möglichkeit, dass auch Hunde eine passive Infektionsquelle darstellen. Dies ist auf Verhaltensweisen der Tiere, wie das Wälzen in Kot und Koprophagie, zurückzuführen. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass infektiöse Oozysten auf diese Weise in das Fell oder den Kot der Tiere gelangen können (Frenkel et al., 2003; Frenkel & Parker, 1996; Lindsay et al., 1997). Die Seroprävalenz der untersuchten Polizeihunde aus Albanien liegt, obwohl ein höherer Cut-off-Titer als in den meisten anderen Studien festgelegt wurde, mit 65,8% vergleichsweise hoch (Dubey, 2010) und damit auch etwas höher als die Seroprävalenzrate von 51,7%, die von albanischen Hunden in Privathand veröffentlicht wurde (Hamel et al., 2015). Zudem wiesen 26,4% der untersuchten Tiere Grenztiter von 1:50 auf. In den wenigen Feldstudien bei Hunden aus Südosteuropa wurden deutlich geringere Seroprävalenzzahlen von 11,2% in Bulgarien bis zu 41% in Serbien veröffentlicht (Chambouris et al., 1989; Kostova et al., 1999; Sibalic, 1977). Vergleichbare Ergebnisse zwischen 62% und 94% *T. gondii* seropositiv getesteter Hunde wurden in der Türkei veröffentlicht (Aslantas et al., 2005; Icen et al., 2010). Die These des hohen Aufkommens dieses Parasiten in Albanien wird durch weitere Studien unterstützt. Mit 63,2% wurden bei mehr Katzen *T. gondii*-Antikörper festgestellt als in anderen südosteuropäischen Ländern (Bobić et al., 2012; Silaghi et al., 2012). Die Seroprävalenz der albanischen Bevölkerung ist, verglichen mit anderen südosteuropäischen Ländern, ebenfalls im oberen Bereich anzusiedeln (Bobić et al.,

2012; Maggi et al., 2009).

In Albanien und Serbien wurde bei Menschen der Konsum von rohem Fleisch als Risikofaktor evaluiert (Djurkovic-Djakovic et al., 2010; Klun et al., 2006; Maggi et al., 2009). Auch bei Hunden aus Albanien erwies sich die Fütterung von rohem Fleisch als Risikofaktor (Hamel et al., 2015). Die Polizeihunde wurden jedoch nach Angaben der Hundeführer mit kommerziellem Trockenfutter gefüttert. Dass einzelne Tiere gelegentlich rohes Fleisch erhalten haben, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In Albaniens Nachbarland Mazedonien waren Menschen mit regelmäßigem Kontakt zu Erde einer höheren Gefahr ausgesetzt, *T. gondii*-Antikörper aufzuweisen (Cvetkovic et al., 2010).

In allen Regionen Albaniens wiesen mehr als die Hälfte der dort untersuchten Hunde *T. gondii*-Antikörper auf. Somit besteht landesweit ein hohes Risiko, mit diesem Parasiten in Kontakt zu kommen. Bobić et al. zeigten, dass in Südosteuropa die Seroprävalenzen bei Menschen von Norden nach Süden abnehmen (Bobić et al., 2011). Mit 70,3% seropositiver Hunde im Norden und 51,3% im Süden Albaniens ist diese Tendenz auch bei den Polizeihunden erkennbar. Das Hundekollektiv war allerdings zu klein, um diese Tendenz statistisch zu bestätigen.

Bei der Untersuchung schwangerer Frauen in Südosteuropa sanken die *T. gondii*-Prävalenzzahlen in den letzten 30 Jahren. Durch diese Entwicklung erhöht sich allerdings die Anzahl der Frauen, die in Gefahr sind, ihr Kind während der Schwangerschaft kongenital zu infizieren (Bobić et al., 2012). Somit ist eine Aufklärung der Frauen, bei sinkenden Prävalenzzahlen in der Bevölkerung, umso wichtiger. Hygienische Maßnahmen nach dem Kontakt mit Erde, Hunden oder Katzen sollte, insbesondere von Schwangeren, eingehalten und der Verzehr von rohem Fleisch vermieden werden (Gollub et al., 2008). Ein entsprechendes Aufklärungs- und Überwachungsprogramm existiert in Albanien bisher nicht (Maggi et al., 2009).

### ***Neospora caninum***

*Neospora caninum* wird weltweit für das Auftreten von Abortgeschehen bei Rindern verantwortlich gemacht. Obwohl auch Hunde an Neosporose erkranken können, zeigten die albanischen Polizeihunde, wie die meisten Hunde mit *N. caninum*-Antikörpern, keine klinischen Symptome (Dubey & Lappin, 2006). Der IFAT gilt als etablierteste Diagnostikmethode für *N. caninum*, wobei die Spezifität

dieses Tests mit höheren Titerstufen steigt (Bjorkman & Uggla, 1999; Dubey & Lindsay, 1996). Daher wurde in der vorliegenden Studie ein vergleichsweise hoher Cut-off- Titer von  $> 1:50$  gewählt. Die Seroprävalenz der Polizeihunde lag bei 12% und war somit mit der Seroprävalenz von albanischen Hunden in Privathand vergleichbar (Hamel et al., 2015). Ähnliche Prävalenzzahlen wurden bei Hunden aus anderen europäischen Ländern veröffentlicht, wobei Tiere aus landwirtschaftlichen Betrieben mit bis zu 51% häufiger serologisch positiv waren (Collantes-Fernandez et al., 2008; Dubey & Schares, 2011). Aus den Nachbarländern Albaniens sind bislang keine Daten verfügbar. In anderen Ländern Südosteuropas (Serbien, Rumänien und der Türkei) lagen die Prävalenzzahlen der untersuchten Hunde mit 17,2%-28,9% etwas höher als die der untersuchten albanischen Polizeihunde (Kuruca et al., 2013; Mitrea et al., 2013; Yildiz et al., 2009). Eine Erklärung ist, dass in diesen südosteuropäischen Studien auch Hofhunde eingeschlossen wurden, für die ein höheres Risiko besteht, mit *N. caninum* in Kontakt zu kommen (Collantes-Fernandez et al., 2008; Mitrea et al., 2013). Außerdem wurde in diesen Studien, wenn angegeben, ein niedriger Cut-off-Titer definiert.

Mehr als die Hälfte der albanischen Bevölkerung arbeitet in der Landwirtschaft und obwohl die Neosporose für die Verursachung von wirtschaftlichen Schäden in der Milchviehwirtschaft bekannt ist, gibt es aus Albanien bislang keine Studien über die *N. caninum*-Seroprävalenz bei Milchkühen. Untersuchungen bei Milchkühen aus Griechenland und Kroatien sind verfügbar. Dabei lagen die Seroaktivitätsraten bei 15,2% und 5,6% (Beck et al., 2010; Sotiraki et al., 2008). Anhand dieser Daten und unter Einbeziehung der Ergebnisse der vorliegenden Studie ist davon auszugehen, dass die Neosporose auch in Albanien ein Problem in der Landwirtschaft darstellt.

### **Einfluss des Alters der Tiere auf die Seroaktivität**

Sowohl in der uni- als auch in der multifaktoriellen Analyse war der Unterschied zwischen der SFG-Rickettsiae-, *Anaplasma* spp.-, *L. infantum*- und *T. gondii* – Seroprävalenz der Junghunde im Vergleich zu der der alten Hunde statistisch signifikant. Auch in vorangegangenen Studien konnte für die Präsenz von Antikörpern gegen diese Pathogene ein Zusammenhang mit dem Lebensalter der Tiere gezeigt werden (Aslantas et al., 2005; Bamorovat et al., 2014; Cabezón et al., 2010; Ebani et al., 2013; Egenvall et al., 2000a; Hamel et al., 2015; Wächter et al.,

2015). Erklärt wurde dies damit, dass ältere Hunde länger einer Umgebung, in der eine entsprechende Infektionsgefahr besteht, ausgesetzt sind und Antikörper über längere Zeit persistieren können (Aslantas et al., 2005; Bamorovat et al., 2014; Ebani et al., 2013; Wächter et al., 2015). Andere Arbeiten konnten zwischen verschiedenen Altersgruppen und der *Anaplasma* spp.-Seroprävalenz allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen (Jensen et al., 2007; Mircean et al., 2012). Ebenso schwanken die Ergebnisse zur Persistenz von *A. phagocytophilum*-Antikörpern zwischen einigen Monaten und mehreren Jahren (Egenvall et al., 1997; Poitout et al., 2005). In Bezug auf *L. infantum* fand eine Studie aus Albanien bei Tieren im Alter von 1-2 Jahren die höchsten Prävalenzen (Bizgha et al., 2009), während in Griechenland bei sehr jungen ( $\leq 1$  Jahr) und sehr alten Tieren ( $> 9$  Jahre) geringere Infektionsraten als bei den mittelalten Tieren ermittelt wurden (Athanasίου et al., 2012). In Studien aus Kroatien und Portugal wurde ein Anstieg der *L. infantum*-Seroprävalenz mit dem Alter beobachtet, wobei die *L. infantum*-Seroprävalenz bei Tieren über 7 (Živičnjak et al., 2005) bzw. über 12 Jahren wieder fiel (Cardoso et al., 2004). Als Begründung nannten die Autoren zum einen eine möglicherweise bessere Resistenzlage älterer Hunde in endemischen Gebieten, sodass diese die Infektion mit der zellulär mediierten Immunantwort und ohne bedeutende humorale Immunantwort kontrollieren können (Athanasίου et al., 2012; Bizgha et al., 2009). Zum anderen wurde vermutet, dass ältere mit *L. infantum* infizierte Hunde eine höhere Todesrate aufweisen (Bizgha et al., 2009; Živičnjak et al., 2005). Diese Beobachtungen können durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden, da die albanischen Polizeihunde über 7 Jahre eine höhere Seroprävalenz als die jüngeren Altersgruppen aufwiesen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass keiner der untersuchten Polizeihunde älter als 10 Jahre war.

Vergleicht man bei allen Pathogenen die Effektgrößen, die sich beim Vergleich der Seroprävalenzzahlen der Junghundegruppe mit denen der Gruppe alter Hunde ergaben, so hatte das Alter den größten Effekt auf die SFG-Rickettsiae-Seroprävalenz (Cramer's  $V=0,54$ ), wohingegen das Alter den geringsten Effekt auf die *R. conorii*-Seroprävalenz (Cramers  $V=0,02$ ) aufwies. Dies ist dahingehend bemerkenswert, als dass aufgrund der Erwartung von Kreuzreaktionen mit ähnlichen Ergebnissen dieser beiden Untersuchungsmethoden gerechnet wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die verschiedenen

Rickettsienarten der Zeckenbissfiebergruppe zur Bildung von unterschiedlich lang persistierenden Antikörpern führen und diese von den in unserer Studie angewandten Methoden unterschiedlich sensitiv erfasst wurden. In der Literatur sind in mediterranen europäischen Ländern bei der Erfassung von *R. conorii*-Seroprävalenzen bei Hunden mittels IFAT sowohl altersunabhängige (Segura-Porta et al., 1998) als auch abhängige (Punda-Polić et al., 1995) Resultate veröffentlicht worden. In Deutschland wies das Alter der Tiere bei mit dem SFG-*Rickettsia*-ELISA ermittelten Seroprävalenzen einen statistisch signifikanten Einfluss auf (Wächter et al., 2015).

Zwar ergab die multiple logistische Regression für Hunde über 7 Jahre im Vergleich zu den Junghunden eine 11,2-fach erhöhte Chance *D. immitis*-Antigene aufzuweisen. Das sehr weite Odds Ratio 95% Konfidenzintervall zeigte jedoch eine große Varianz dieses Ergebnisses an. Dass dieser Unterschied in der multiplen Analyse signifikant, jedoch in der bivarianten Analyse nicht signifikant war, kann darauf zurückzuführen sein, dass die Faktoren Geschlecht und Herkunft der Tiere nicht in die bivariate Berechnung mit einbezogen wurden. Auch in einigen anderen Studien zeigten insbesondere junge Tiere von unter 2 Jahren statistisch signifikant geringere *D. immitis*-Infektionsraten als ältere Tiere (Mircean et al., 2012; Montoya et al., 2006; Yildirim et al., 2007). Dahingegen konnten Tasic et al. und Rapti et al. dem Alter der Tiere keinen Einfluss auf das Infektionsrisiko konstatieren, wobei bei beiden Studien keine Tiere von unter einem Jahr mit einbezogen wurden (Rapti & Rehbein, 2010; Tasić et al., 2008). Speziell in diesem Alter sind geringere Nachweisraten zu erwarten, da *D. immitis*-Antigene in der Regel erst 6-8 Monate nach der Infektion festzustellen sind (Nelson et al., 2005).

Ein mittlerer Effekt des Alters auf die *N. caninum*- und *E. canis*-Seroprävalenz wurde festgestellt, wobei die fehlende Signifikanz in der geringen Stichprobenzahl begründet sein kann. Einige Autoren konnten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und der *N. caninum*- bzw. *E. canis*-Seroprävalenz feststellen (Azevedo et al., 2005; Rasmussen & Jensen, 1996; Yildiz et al., 2009). Bezüglich *N. caninum* kamen jedoch nicht wenige Studien zu einem anderen Schluss und wiesen bei älteren Hunden signifikant häufiger *N. caninum*-Antikörper nach als bei Junghunden. Anhand dessen argumentierten sie, dass der vertikale Übertragungsweg bei Hunden eine größere Rolle spielt als der horizontale (Capelli et al., 2004; Collantes-Fernandez

et al., 2008; Hamel et al., 2015; Mitrea et al., 2013). Zumal Baber und Trees zeigen konnten, dass 80% der Welpen von *N. caninum*-seropositiven Hündinnen keine *N. caninum*-Antikörper aufwiesen (Barber & Trees, 1998).

### **Einfluss des Geschlechts der Tiere auf die Seroaktivität**

Bei keinem der untersuchten Pathogene waren statistisch signifikante Seroprävalenzunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren auszumachen. Frühere Studien zeigten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss des Geschlechts der Tiere auf das Vorhandensein von *R. conorii*- (Mannelli et al., 2003), *Anaplasma* spp.- (Jensen et al., 2007; Mircean et al., 2012), *E. canis*- (Jensen et al., 2003; Mircean et al., 2012; Tsachev et al., 2006a), *L. infantum*- (Athanasίου et al., 2012; Cabezón et al., 2010; Jensen et al., 2003), *N. caninum*- (Cabezón et al., 2010) oder *T. gondii*- (Aslantas et al., 2005; Cabezón et al., 2010) Antikörpern bzw. *D. immitis*-Antigenen (Jensen et al., 2003; Rapti & Rehbein, 2010).

Im Gegenzug dazu wurden aber in einer anderen Studie bei männlichen Tieren überproportional häufig *R. conorii*-Antikörper nachgewiesen (Solano-Gallego et al., 2006a). Es wurde vermutet, dass männliche Hunde ein höheres Risiko haben an einer *R. conorii*-Infektion erkranken als weibliche Hunde (Solano-Gallego et al., 2006a; Solano-Gallego et al., 2006b). Außerdem ergaben Studien aus Albanien, Kroatien und Spanien signifikant höhere *L. infantum*-Seroprävalenzzahlen bei männlichen Hunden (Fisa et al., 1999; Živičnjak et al., 2005). Erklärt wurde dies einerseits mit einem möglichen immunsuppressiven Effekt des Testosterons, wie er bei mit *L. donovani* infizierten Makrophagen (Zhang et al., 2001) und mit *Leishmania* spp. infizierten Hamstern demonstriert werden konnte (Travi et al., 2002). Andererseits wurde eine höhere Sterblichkeitsrate *L. infantum*-positiver weiblicher Hunde während der Trächtigkeit und Welpenaufzucht als mögliche Erklärung genannt (Fisa et al., 1999). Da von den albanischen Polizeihunden doppelt so viele männliche wie weibliche Hunde *L. infantum*-Antikörper hatten, kann auch hier eine Tendenz zur Prädisposition des männlichen Geschlechts vermutet werden, allerdings war diese nur schwach (Cramer's  $V = 0,096$ ) ausgeprägt.

Des Weiteren zeigten einige Studien, dass männliche Hunde einer größeren *D. immitis*-Infektionsgefahr ausgesetzt sind als weibliche Tiere (Mircean et al., 2012;

Song et al., 2003; Yildirim et al., 2007). Dies wurde damit erklärt, dass männliche Hunde öfter im Freien gehalten werden als weibliche (Song et al., 2003). Zudem wurde männlichen Hunden eine höhere Attraktivität für Stechmücken unterstellt (Yildirim et al., 2007). In der vorliegenden Studie unterschied sich die Haltung von männlichen und weiblichen Hunden nicht. Dennoch lag der Antigennachweis bei männlichen Tieren doppelt so hoch wie bei weiblichen Tieren.

Letztlich konnte bei serologischen Untersuchungen zu *N. caninum* sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Hunden ein statistisch signifikant höheres Risiko nachgewiesen werden, *N. caninum*-seropositiv zu sein (Wouda et al., 1999; Yildiz et al., 2009). Letzteres wurde auf einen möglichen Anstieg des Antikörpertiters während der Trächtigkeit der weiblichen Hunde zurückgeführt (Rasmussen & Jensen, 1996; Wouda et al., 1999). Da sich die Seroprävalenz männlicher und weiblicher Polizeihunde mit 12,6% und 10,0% kaum unterschied, war in der vorliegenden Studie kein Hinweis auf eine Geschlechtsprädisposition gegeben.

### **Kopräsenz von Antikörpern gegen vektorübertragene Pathogene**

Bei Betrachtung der Kopräsenz von Antikörpern gegen vektorübertragene Pathogene war der stärkste statistische Zusammenhang, mit einem Cramer's V Wert von 0,35, zwischen dem Nachweis von *E. canis*- und *Anaplasma* spp.-Antikörpern auszumachen. Dieses Resultat ist nicht überraschend, da das Auftreten von serologischen Kreuzreaktionen zwischen den Pathogenen *E. canis* und *A. phagocytophilum*, insbesondere nach überstandener akuter Phase, bei niedrigen Titerstufen, beschrieben ist (Waner et al., 2001; Waner et al., 1998). Dementsprechenden fanden auch andere Autoren einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen diese beiden Pathogenen (Solano-Gallego et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2006b). Innerhalb der Ordnung *Rickettsiales* bestand außerdem ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Anaplasma* spp.- und *R. conorii*-Antikörpern. Sollano-Gallego et al. beobachteten in ihrer Studie ebenfalls, dass *R. conorii*-seropositive Hunde überproportional häufig *Anaplasma* spp.-Antikörper sowie *E. canis*-Antikörper aufwiesen. (Solano-Gallego et al., 2006b). Zwar sind keine konkreten Studien zu Kreuzreaktionen von *R. conorii*- und *Anaplasma* spp.-Antikörpern bei Hunden verfügbar, jedoch wird in der Humanmedizin das Vorkommen von serologischen Kreuzreaktionen zwischen *Rickettsia* spp. mit *Ehrlichia* spp. oder *Anaplasma* spp. als möglich aber gering eingestuft (Chapman



et al., 2006). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Hunde mit Ehrlichiose niedrige SFG-Rickettsien-Titer aufwiesen (Greene et al., 1985). Dementsprechend fiel bei der Auswertung der serologischen Daten der Polizeihunde auf, dass mehr als die Hälfte der als *E. canis*-positiv eingestuften Hunde Grenztiter aufwiesen und zudem bei allen diesen Tieren auch Antikörper gegen SFG-Rickettsien und/oder *Anaplasma* spp. vorhanden waren. Es ist somit denkbar, dass die *E. canis*-Grenztiter auf Kreuzreaktionen zurückzuführen sind und die tatsächliche *E. canis*-Infektionsrate der albanischen Polizeihunde geringer einzuschätzen ist. Weiterführende Studien sind nötig, um das Auftreten von serologischen Kreuzreaktionen innerhalb der Ordnung *Rickettsiales* besser beurteilen zu können.

Neben dem Vorkommen von Kreuzreaktionen sind gleichzeitige oder sequenzielle Infektionen mit mehreren Erregern als mögliche Ursache für Kopräsenz von Antikörpern in Betracht zu ziehen. *R. conorii*, *E. canis*, *B. vogeli* und, soweit bekannt, auch *A. platys* werden vom selben Vektor, *Rh. sanguineus*, übertragen (Groves et al., 1975; Inokuma et al., 2000; Latrofa et al., 2014; Lewis et al., 1977; Simpson et al., 1991; Socolovski et al., 2009; Uilenberg et al., 1989). Dies könnte auch erklären, warum *E. canis*-seropositive Tiere statistisch signifikant häufiger *B. canis*-seropositiv waren als *E. canis*-seronegative Hunde. Es ist zudem beschrieben, dass Infektionen mit *A. phagocytophilum* (Woldehiwet, 2008), *E. canis* (Harrus et al., 2003; Mylonakis et al., 2004; Nyindo et al., 1980) und *Babesia* spp. (Adachi et al., 1993) das Immunsystem beeinflussen, was zur Begünstigung von Sekundärinfektionen führen kann. Viele Berichte über Koinfektionen der genannten Pathogene bei Hunden sind bereits publiziert worden (Cardoso et al., 2010; Dyachenko et al., 2012; Gaunt et al., 2010; Mekuzas et al., 2009; Otranto et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2015). Letztlich konnte das Vorliegen von gleichzeitigen Koinfektionen bei den untersuchten Polizeihunden nicht bewiesen werden, da bei keinem mehr als ein Pathogen mit direkten Methoden nachweisbar war.

### **Kopräsenz von Antikörpern gegen die Protozoen *N. caninum*, *L. infantum* und *T. gondii***

Bemerkenswert ist der mittlere Zusammenhang (Cramer's  $V = 0,35$ ) mit statistischer Signifikanz ( $p = 0,002$ ), der zwischen dem Nachweis von *N. caninum*- und *L. infantum*-Antikörpern festgestellt wurde. Als Erklärung hierfür wird das Auftreten von Kreuzreaktionen als unwahrscheinlich erachtet, da bei Anwendung

des IFATs zum Nachweis von *L. infantum*-Antikörpern keine Kreuzreaktionen mit *N. caninum*-Antikörpern festgestellt werden konnten (Mettler et al., 2005; Zanette et al., 2014). Doch die Anwendung von auf ELISA-basierten serologischen Methoden zur *L. infantum*-Diagnostik zeigten, dass serologische Kreuzreaktionen zwischen diesen Pathogenen durchaus möglich sind (Mettler et al., 2005; Zanette et al., 2014). Einige Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *L. infantum* und *N. caninum*-Antikörpern feststellen (Andreotti et al., 2006; Lopes et al., 2011; Paulan Sde et al., 2013). Andere fanden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie durchaus einen statistischen Zusammenhang zwischen diesen Pathogenen (Cringoli et al., 2002; Sharifdini et al., 2011). Die Autoren führten dies darauf zurück, dass möglicherweise die durch *L. infantum*-Infektionen verursachte Immunsuppression *N. caninum*-Infektionen begünstigt (Barbiéri, 2006; Cringoli et al., 2002; Sharifdini et al., 2011). Dass Koinfektionen mit *L. infantum* und *N. caninum* vorkommen, konnte bei einem italienischen Hund nachgewiesen werden (Tarantino et al., 2001).

Es gibt nur wenige Studien über den Vergleich und die Evaluation verschiedener serologischer Diagnostikmethoden von *T. gondii*-Infektionen bei Hunden. Dabei wurden hauptsächlich mögliche Kreuzreaktionen mit *N. caninum* berücksichtigt. Beide Parasiten weisen eine ähnliche Antigenstruktur auf, daher kann es insbesondere bei niedrigen Titerstufen zu Kreuzreaktionen kommen (Dubey, 2010; Liao et al., 2005; McAllister et al., 1996; Nishikawa et al., 2002; Silva et al., 2007). Das Auftreten von Kreuzreaktion von *N. caninum* mit *T. gondii* bei einem Cut-off Titer von 1:100 wird als gering eingeschätzt. (Dubey & Lindsay, 1996; Silva et al., 2007). Jedoch wiesen alle Polizeihunde, die *N. caninum*-Antikörper hatten, auch eine *T. gondii*-Seroaktivität auf und der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *T. gondii*- und *N. caninum*-Antikörpern war statistisch signifikant. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Studien gemacht. Dies wurde sowohl mit dem Vorkommen von Kreuzreaktionen, als auch mit dem gehäuftem Auftreten von Koinfektionen mit diesen beiden Pathogenen erklärt (Nishikawa et al., 2002; Vaclavek et al., 2007; Yildiz et al., 2009).

### **Schlussfolgerung**

Bei Polizeihunden aus verschiedenen Teilen Albaniens wurde eine nicht unerhebliche Expositionsrate für vektorübertragene Pathogene sowie für *N. caninum* und *T. gondii* nachgewiesen. Da es sich bei vielen dieser Pathogene um

Zoonoseerreger handelt und die Polizeihunde als Indikator für die Präsenz dieser Pathogene in der Umwelt des Menschen dienen können, sind diese Ergebnisse sowohl aus veterinärmedizinischer als auch humanmedizinischer Sicht von Bedeutung. Dabei ist insbesondere die vergleichsweise hohe *T. gondii*-, SFG-Rickettsiae- und *L. infantum*-Seroprävalenz der Polizeihunde zu beachten. Entsprechende Aufklärungs-, Präventions- und Hygienemaßnahmen sind anzuraten.

Hunde aus Südalbanien waren statistisch signifikant häufiger *D. immitis*-positiv als Hunde, die aus Nordalbanien stammten. Somit ist für Hunde im Süden des Landes von einer höheren *D. immitis*-Infektionsgefahr auszugehen und die Durchführung einer regelmäßigen Herzwurmprophylaxe für diese Hunde besonders essentiell.

Den stärksten Einfluss auf den Nachweis von Antikörpern gegen vektorübertragene Pathogene und *T. gondii* hatte das Alter der Tiere. Dies erklärt sich dadurch, dass ältere Tiere bereits länger einer Infektionsgefahr ausgesetzt sind und die gebildeten Antikörper nach einem Pathogenkontakt meist einige Zeit persistieren.

Bemerkenswert ist zudem, dass fast die Hälfte der Hunde seropositiv auf mindestens zwei von vektorübertragene Pathogene getestet wurden und zudem ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Anaplasma* spp.- und *E. canis*-, zwischen *Anaplasma* spp.- und *R. conorii*-, und zwischen *E. canis*- und *B. canis*-Antikörpern bestand. Dies kann einerseits durch das Auftreten von Kreuzreaktionen, welche speziell zwischen *E. canis*- und *Anaplasma* spp.-Antikörpern beschrieben sind, bedingt sein. Andererseits teilen sich einige der untersuchten Pathogene in *Rh. sanguineus* denselben Zeckenvektor, wodurch Koinfektionen begünstigt werden. Desweiteren können Infektionen mit Pathogenen wie *L. infantum* einen immunsuppressiven Effekt haben und somit Sekundärinfektionen begünstigen. Dies ist besonders im Hinblick auf *L. infantum*- und *N. caninum*- Koinfektionen zu beachten, da zwischen dem Auftreten von Antikörpern gegen diese beiden Pathogene in dieser Studie eine statistische Signifikanz festgestellt wurde. Einige Hunde wurden seropositiv auf bis zu 5 verschiedene Pathogene getestet. Dies zeigt, dass die Hunde in Albanien häufig verschiedenen Pathogenen ausgesetzt sind.

Letztlich waren nur 12 Hunde sowohl serologisch als auch molekularbiologisch negativ auf alle in dieser Studie untersuchten vektorübertragenen Pathogene. Die

Waschungen mit Neostomosan scheinen den Kontakt zu vektorübertragenen Pathogenen nicht entscheidend zu reduzieren. Da dieses Produkt, nach Herstellerangaben, die Tiere 2-3 Tage vor einer Reinfestation von Zecken schützt, sollte entweder die Frequenz dieser Waschungen erhöht oder andere Präventionsstrategien in Betracht gezogen werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Albanien, einem südosteuropäischen Land mit unterschiedlichen klimatischen Bedingungen, die die Verbreitung von Vektoren beeinflussen können, ist über das Vorkommen vektorübertragener und zoonotischer Pathogene bei Hunden nur wenig bekannt. Polizeihunde sind durch die enge Zusammenarbeit mit den Menschen gut geeignet, um die Präsenz zoonotischer Pathogene in der menschnahen Umwelt, in der sie sich bewegen, widerzuspiegeln. Ziel dieser Arbeit war es, die Prävalenz bzw. Seroprävalenz von *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, haemotrophen Mykoplasmen sowie verschiedenen vektorübertragenen Pathogenen bei albanischen Polizeihunden aus verschiedenen Regionen des Landes zu bestimmen. Dabei wurden als mögliche Risikofaktoren das Alter, das Geschlecht und die Herkunft der Tiere untersucht. Zudem wurden das Auftreten von Koinfektionen und der Nachweis von Antikörpern gegen mehrere Pathogene näher betrachtet.

Von 119 Polizeihunden, die fast ausnahmslos einer Rasse (Deutscher Schäferhund) angehörten und die aus verschiedenen Regionen Albaniens stammten, wurden 119 EDTA-Blutproben und 117 Serumproben entnommen. Diese wurden mit direkten und indirekten Methoden auf die Protozoen *T. gondii* (IFAT) und *N. caninum* (IFAT), auf vektorübertragene Pathogene von zoonotischer und veterinärmedizinischer Bedeutung (SFG-Rickettsiae [ELISA, IFAT], *Anaplasma* spp. [PCR, IFAT], *Ehrlichia canis* [PCR, IFAT], *Babesia* spp. [PCR, IFAT], *Leishmania infantum* [PCR, IFAT], *Hepatozoon canis* [PCR], *Dirofilaria immitis* [ELISA]) und auf haemotrophe Mykoplasmen [PCR] untersucht. Bei der statistischen Auswertung wurden die exakten Konfidenzintervalle nach der Methode von Clopper und Pearson berechnet. Für die Beurteilung statistischer Zusammenhänge kam die Bestimmung des Cramer's V, der Fishers-exact-Test, die Berechnung des Odds Ratios (nur bei der geographischen Analyse) und die multiple logistische Regression zum Einsatz.

Bei vier Hunden konnte *L. infantum* mittels PCR nachgewiesen werden. Bei zwei Tieren gelang der molekularbiologische Nachweis von *A. platys*. In keiner Blutprobe wurde DNA von *M. haemocanis*, *Cand. M. haematoparvum*, *H. canis*, *B. canis* oder *E. canis* gefunden. Bei 11,2 % der albanischen Polizeihunde war *D. immitis*-Antigen nachweisbar. Vergleichsweise hohe Seroprävalenzen wurden in

Bezug auf die zoonotischen Pathogene *T. gondii* (65,0%), Rickettsien der Zeckenbissfiebergruppe (71,5 %ELISA, 61,5% (IFAT)), *Anaplasma* spp. (31,5%) und *L. infantum* (12%) festgestellt. Die weiteren Seroprävalenzen ergaben sich wie folgt: *E. canis* 17,9%, *N. caninum* 12% und *B. canis* 3,4%. Insgesamt sieben Hunde waren PCR-negativ und wiesen keine Antikörper gegen die untersuchten Pathogene auf. Statistisch signifikant mehr Hunde aus Südalbanien (24,3%) wurden im Vergleich zu den Hunden aus Nordalbanien (5,4%,  $p=0,046$ ) positiv auf *D. immitis* getestet. Die erwarteten regionalen Prävalenzunterschiede aufgrund unterschiedlicher klimatischer Bedingungen, die die Vektoren in der Küstenregion im Vergleich zur Bergregion im Inland vorfinden, waren statistisch nicht nachweisbar. Tiere über 7 Jahre zeigten eine statistisch signifikant höhere SFG-Rickettsiae-, *L. infantum*-, *Anaplasma* spp.- und *T. gondii*- Seroprävalenzrate als Tiere, die 3 Jahre und jünger waren. Dies spricht für ein mit dem Alter steigendes Expositionsrisiko und eine lange Antikörperpersistenz. Das Geschlecht der Hunde hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Nachweis von den mit serologischen Methoden untersuchten Pathogenen. Mehr als die Hälfte der 103 Hunde, die seropositiv auf ein vektorenübertragenes Pathogene getestet wurden, war seropositiv auf mindestens ein weiteres vektorübertragenes Pathogen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang war zwischen der *Anaplasma* spp.- und *E. canis*-, zwischen *Anaplasma* spp.- und *R. conorii*-, und zwischen *E. canis*- und *B. canis*-Antikörperpräsenz auszumachen. Diese Zusammenhänge können teilweise durch das Vorkommen von Kreuzreaktionen erklärt werden. Zum anderen werden *A. platys*, *E. canis*, *R. conorii* und *B. canis vogeli* vom selben Vektor, *Rh. sanguineus*, übertragen, wodurch auch das Auftreten von Koinfektionen mit diesen Pathogenen naheliegend ist. Letztlich besteht auch die Möglichkeit, dass schon bestehende Infektionen Sekundärinfektionen begünstigen. Dass die *L. infantum*-seropositiven Polizeihunde dieser Studie überproportional häufig *N. caninum*-Antikörper aufwiesen, kann somit durch eine Beeinflussung des Immunsystems beim Vorliegen einer *L. infantum*-Infektion bedingt sein. Alle Hunde mit *N. caninum*-Antikörpern wiesen auch *T. gondii*-Antikörper auf.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Hunde als auch Menschen in Albanien einem nicht unerheblichen Risiko ausgesetzt sind, mit den untersuchten Pathogenen in Kontakt zu kommen. Dieses Risiko sollte durch bessere Präventions-, Aufklärungs- und Hygienemaßnahmen minimiert werden.

## VII. SUMMARY

Albania is a country in South-East Europe with different climatic regions which can affect the distribution of vector-borne infections. Knowledge on the prevalence of the zoonotic and animal pathogens in dogs from Albania is thus far limited. Police dogs often operate in public places; they have contact with many people and are often kept in densely populated areas. Due to their close relationship to humans, these dogs may therefore also be used as sentinel animals for potential zoonotic infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence of infection and/or seroprevalence of *T. gondii*, *N. caninum*, haemotropic mycoplasmas and various vector-borne pathogens in Albanian police dogs with attention to the occurrence of co-infections and co-exposure as well as the potential association to the geographic location of the dogs in the country. Furthermore age and gender of the animals were analysed as risk factors.

Samples were collected from 119 police dogs, mainly German Shepherds, which were deployed throughout Albania. Direct and/or indirect methods were used to examine 119 whole blood and 117 serum samples for the protozoans *Toxoplasma gondii* (IFAT) and *Neospora caninum* (IFAT), various vector-borne pathogens of zoonotic and veterinary concern (SFG-Rickettsiae [ELISA, IFAT], *Anaplasma* spp. [PCR, IFAT], *Ehrlichia canis* [PCR, IFAT], *Babesia* spp. [PCR, IFAT], *Leishmania infantum* [PCR, IFAT], *Hepatozoon canis* [PCR], *Dirofilaria immitis* [ELISA]), and haemotropic mycoplasmas [PCR]. For statistical analyses the exact 95% confidence interval was computed using the Clopper and Pearson method. To obtain information of statistical associations the Cramer's V, the Fisher's exact test and multiple logistic regression analyses were applied. In case of significant differences associated with the geographical location of the dogs, the odds ratio [OR] was calculated.

DNA of *L. infantum* and *A. platys* was detected in the blood of four and two dogs, respectively, but all samples were negative for DNA of *E. canis*, *Babesia* spp., *H. canis* and haemotropic mycoplasmas. *Dirofilaria immitis* antigen was detected in 11.2% of the serum samples. The overall seroprevalences were: SFG Rickettsiae (ELISA), 71.5%; *Rickettsia conorii* (IFAT), 61.5%; *T. gondii*, 65.0 %; *Anaplasma* spp., 31.6%; *E. canis*, 17.9%; *L. infantum*, 12.0%; *N. caninum*, 12.0% and *Babesia canis*, 3.4%. Seven dogs were PCR-negative and seronegative for all tested

pathogens. Significantly more dogs from South Albania (24.3%) had antigen of *D. immitis* than dogs from North Albania (5.4%,  $p=0.046$ ). Contrary to expectations a statistically significant higher exposure risk to vector-borne-pathogens was not found for dogs from the Mediterranean coastal region. Age was found to be a risk factor for exposure to *T. gondii*, SFG Rickettsiae, *Anaplasma* spp. and *L. infantum* which supports a pattern of cumulative exposure risk over time and long-lasting antibody persistence. Comparison of seroprevalence percentages in male and female dogs revealed no statistically significant differences for any of the investigated pathogens. Co-exposure of up to five vector-borne pathogens was found in 51.5% of the 103 dogs that were seropositive for at least one vector-borne pathogen. The simultaneous presence of antibodies against two vector-borne pathogens was statistically significant for the following pairings: *Anaplasma* spp. and *E. canis*; *E. canis* and *B. canis*; *Anaplasma* spp. and *R. conorii* (IFAT). Co-exposure can be explained by the possible occurrence of serological cross reactions. Furthermore co-infections are likely as *E. canis*, *A. platys* and *Babesia vogeli* share the same vector tick, *Rh. sanguineus*. Some pathogens, like *L. infantum*, can cause immunosuppression which consequently predisposes affected animals to other infections. This can be an explanation for the statistical significant correlation between the presence of *L. infantum* and *N. caninum* antibodies. Every dog that tested seropositive for *N. caninum* was also seropositive for *T. gondii*.

Results of this study indicate a considerable risk of infection for dogs and/or humans with *T. gondii* and *N. caninum* and a range of zoonotic vector-borne bacterial and protozoan pathogens. To reduce the infection risk for humans and animals corresponding prevention and hygiene strategies should be applied.



## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, K., Ueno, C. & Makimura, S. (1993) Immunosuppression in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J Vet Med Sci*, 55(3), pp. 503-505.
- Adhami, J., Bashari, V., Murati, N., Bebej, S. & Gjoka, D. (1983) [Epidemiology of leishmaniasis in the Gjirokastra Distrikt (South Albania)] in Albanian. *Buletini i Universitetit te Tiranas, Seria Shkencat Mjekesore*, 2, pp. 65-73.
- Adhami, J. & Murati, N. (1977) [ Canine leishmaniasis and the natural reservoir of visceral leishmaniasis in Albania ] in Albanian. *Buletini i Universitetit te Tiranas, Seria Shkencat Mjekesore*, 4, pp. 69-74.
- Adhami, J. & Murati, N. (1987) [The presence of the mosquito *Aedes albopictus* in Albania] in Albanian. *Rev Mjekësore*, 1, pp. 13-16.
- Adhami, J. & Reiter, P. (1998) Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (*Diptera: Culicidae*) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc*, 14(3), pp. 340-343.
- Al-Qassab, S., Reichel, M. P., Su, C., Jenkins, D., Hall, C., Windsor, P. A., Dubey, J. P. & Ellis, J. (2009) Isolation of *Toxoplasma gondii* from the brain of a dog in Australia and its biological and molecular characterization. *Vet Parasitol*, 164(2-4), pp. 335-339.
- Alexandre, N., Santos, A. S., Bacellar, F., Boinas, F. J., Nuncio, M. S. & de Sousa, R. (2011) Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks Tick Borne Dis*, 2(2), pp. 119-122.
- Alhumaidan, H., Westley, B., Esteva, C., Berardi, V., Young, C. & Sweeney, J. (2013) Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion*, 53(1), pp. 181-186.
- Allison, R. W. & Little, S. E. (2013) Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*, 42(2), pp. 127-144.
- Alves Neto, A. F., Bandini, L. A., Nishi, S. M., Soares, R. M., Driemeier, D., Antoniassi, N. A., Schares, G. & Gennari, S. M. (2011) Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *J Parasitol*, 97(1), pp. 135-139.

American Heartworm Society (2005) 2005 guidelines for the diagnosis, prevention and management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Vet Parasitol*, 133(2–3), pp. 255-266.

Amusategui, I., Tesouro, M. A., Kakoma, I. & Sainz, A. (2008) *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(6), pp. 797-803.

Amyx, H. L. & Huxsoll, D. L. (1973) Red and gray foxes--potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*. *J Wildl Dis*, 9(1), pp. 47-50.

Andersson, M., Turcitu, M. A., Stefanache, M., Tamba, P., Barbuceanu, F. & Chitimia, L. (2013) First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania--a case report. *Ticks Tick Borne Dis*, 4(4), pp. 317-319.

Andoni, E., Rapti, D., Postoli, R., Dimco, E. & Abeshi, J. (2013) Clinicopathological findings in dogs naturally infected dogs with Babesia. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), pp. 185-189.

Andoni, E., Rapti, D., Postoli, R. & Zalla, P. (2012) Haematologic changes in dogs naturally infected with Babesia. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 11(3), pp. 155-158.

Andreotti, R., Oliveira, J. M., Silva, E. A., Oshiro, L. M. & Matos Mde, F. (2006) Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet Parasitol*, 135(3-4), pp. 375-379.

Antognoni, M. T., Veronesi, F., Morganti, G., Mangili, V., Fruganti, G. & Miglio, A. (2014) Natural infection of *Anaplasma platys* in dogs from Umbria region (Central Italy). *Vet Ital*, 50(1), pp. 49-56.

Aptouramani, M., Theodoridou, M., Syrogiannopoulos, G., Mentis, A., Papaevangelou, V., Gaitana, K., Daponte, A. & Hadjichristodoulou, C. (2012) A dedicated surveillance network for congenital toxoplasmosis in Greece, 2006-2009: assessment of the results. *BMC Public Health*, 12, 1019.

Aslantas, O., Ozdemir, V., Kilic, S. & Babur, C. (2005) Seroepidemiology of

leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol*, 129(3-4), pp. 187-191.

Athanasίου, L. V., Kontos, V. I., Saridomichelakis, M. N., Rallis, T. S. & Diakou, A. (2012) A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop*, 122(3), pp. 291-295.

Atkins, C. E., Keene, B. W. & McGuirk, S. M. (1988) Investigation of caval syndrome in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *J Vet Intern Med*, 2(1), pp. 36-40.

Atwell, R., Sheridan, A. & Baldock, F. (1988) An evaluation of the Dirochek test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Aust Vet J.*, 65(5), pp. 161-162.

Avellis, F. O., Kramer, L. H., Mora, P., Bartolino, A., Benedetti, P. & Rivasi, F. (2011) A case of human conjunctival dirofilariosis by *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(4), pp. 451-452.

Ayoob, A. L., Hackner, S. G. & Prittie, J. (2010) Clinical management of canine babesiosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20(1), pp. 77-89.

Azevedo, S. S., Batista, C. S. A., Vasconcellos, S. A., Aguiar, D. M., Ragozo, A. M. A., Rodrigues, A. A. R., Alves, C. J. & Gennari, S. M. (2005) Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res Vet Sci*, 79(1), pp. 51-56.

Bamorovat, M., Sharifi, I., Mohammadi, M. A., Fasihi Harandi, M., Mohebbi, M., Malekpour Afshar, R., Babaei, Z., Ziaali, N. & Aflatoonian, M. R. (2014) Canine visceral leishmaniasis in kerman, southeast of iran: a seroepidemiological, histopathological and molecular study. *Iran J Parasitol*, 9(3), pp. 342-349.

Bandi, C., Dunn, A. M., Hurst, G. D. D. & Rigaud, T. (2001) Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends Parasitol*, 17(2), pp. 88-94.

Baneth, G. (2006a) *Hepatozoon canis* infection. In: Greene, C.E., Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 698-704.

Baneth, G. (2006b) Leishmaniasis. In: Greene, C.E., Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 685-698.

- Baneth, G. (2011) Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet Parasitol*, 181(1), pp. 3-11.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L. & Schnittger, L. (2015) Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors*, 8(1), 207.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24(7), pp. 324-330.
- Baneth, G., Mathew, J. S., Shkap, V., Macintire, D. K., Barta, J. R. & Ewing, S. A. (2003) Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends Parasitol*, 19(1), pp. 27-31.
- Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I. & Shkap, V. (2001) Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Parasitol*, 87(3), pp. 606-611.
- Baneth, G., Samish, M. & Shkap, V. (2007) Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol*, 93(2), pp. 283-299.
- Baneth, G. & Weigler, B. (1997) Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J Vet Intern Med*, 11(6), pp. 365-370.
- Baneth, G., Zivotofsky, D., Nachum-Biala, Y., Yasur-Landau, D. & Botero, A. M. (2014) Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasit Vectors*, 7, 118.
- Barber, J. S. & Trees, A. J. (1996) Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet Rec*, 139(18), pp. 439-443.
- Barber, J. S. & Trees, A. J. (1998) Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int J Parasitol*, 28(1), pp. 57-64.
- Barbiéri, C. L. (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), pp. 329-337.
- Bartsch, R. C. & Greene, R. T. (1996) Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline

and/or doxycycline. *J Vet Intern Med*, 10(4), pp. 271-274.

Bates, P. A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37(10), pp. 1097-1106.

Beck, R., Marinculić, A., Mihaljević, Ž., M., B. & Martinković, F. (2010) Seroprevalence and potential risk factors of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia. *Veterinarski Arhiv*, (80), pp. 163-171.

Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T. & Cacciò, S. M. (2009) Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol*, 39(7), pp. 843-848.

Beugnet, F. & Marić, J.-L. (2009) Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol*, 163(4), pp. 298-305.

Bino, S. (2010) Leishmaniasis in Albania. *Int J Infekt Dis*, 14 S1, p. e167

Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Alleman, A. R. & Pitulle, C. (2002) Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *Am J Vet Res*, 63(10), pp. 1385-1388.

Bizgha, B., Laci, D., Dharmo, G., Keci, R. & Belegu, K. (2013) Survey for canine leishmaniosis. *J Anim Vet Adv*, 12, pp. 442-446.

Bizgha, B., Postoli, R., Rapti, D., Zella, P., Koleci, X. & Llokmani, A. (2009) Prevalence of leishmaniosis infection in south Albania. *IV International Symposium of Livestock Production, Struga, Macedonia, Abstr.*, p. 240.

Bjorkman, C. & Uggl, A. (1999) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*, 29(10), pp. 1497-1507.

Blanco, J. R. & Oteo, J. A. (2002) Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 8(12), pp. 763-772.

Bobić, B., Klun, I., Nikolić, A. & Djurković-Djaković, O. (2012) *Toxoplasma gondii* infection in south-east Europe: Epidemiology and epizootology. *InTech*. pp. 37-54

Bobić, B., Nikolic, A., Klun, I. & Djurkovic-Djakovic, O. (2011) Kinetics of *Toxoplasma* infection in the Balkans. *Wien Klin Wochenschr*, 123 Suppl 1, pp. 2-6.

Boozer, A. L. & Macintire, D. K. (2003) Canine babesiosis. *Vet Clin North Am*

*Small Anim Pract*, 33(4), pp. 885-904.

Bordoskii, A. & Savin, Z. (1970) A contribution to the study of the incidence of visceral leishmaniasis in dogs in Montenegro. *Acta Parasitologica Jugoslavica*, 1, pp. 33-36.

Brandao, L. P., Hagiwara, M. K. & Myiashiro, S. I. (2003) Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Vet Parasitol*, 114(4), pp. 253-265.

Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C. & Hancock, S. I. (1998) Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol*, 36(9), pp. 2645-2651.

Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Quorllo, B. A., Saito, T. B., Maggi, R. G., Blanton, L. S. & Bouyer, D. H. (2014) Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. *Parasit Vectors*, 7, 298.

Breitschwerdt, E. B., Walker, D. H., Levy, M. G., Burgdorfer, W., Corbett, W. T., Hurlbert, S. A., Stebbins, M. E., Curtis, B. C. & Allen, D. A. (1988) Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *Am J Vet Res*, 49(1), pp. 70-76.

Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R. J., Bjoersdorff, A., Blanco, J. R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P. E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, A., Lotric Furlan, S., Maurin, M., Oteo, J. A., Parola, P., Perez-Eid, C., Peter, O., Postic, D., Raoult, D., Tellez, A., Tselentis, Y. & Wilske, B. (2004) Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 10(12), pp. 1108-1132.

Brunner, C., Hendrix, C., Blagburn, B. & Hanrahan, L. (1988) Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. *J Am Vet Med Ass* 192(10), pp. 1423-1427.

Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S. F. & Philip, R. N. (1979) *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*, 36(4), pp. 357-367.

- Cabezón, O., Millán, J., Gomis, M., Dubey, J. P., Ferroglío, E. & Almería, S. (2010) Kennel dogs as sentinels of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in Majorca Island, Spain. *Parasitol Res*, 107(6), pp. 1505-1508.
- Camacho, A. T., Guitián, E. J., Pallas, E., Gestal, J. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K., Telford, S. R., 3rd & Spielman, A. (2004) Azotemia and mortality among *Babesia microti*-like infected dogs. *J Vet Intern Med*, 18(2), pp. 141-146.
- Camacho, A. T., Pallas, E., Gestal, J. J., Guitián, F. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K. & Telford, S. R. (2001) Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Vet Rec*, 149(18), pp. 552-555.
- Cancrini, G., Frangipane di Regalbano, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S. & Pietrobelli, M. (2003) *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol*, 118(3-4), pp. 195-202.
- Cancrini, G. & Gabrielli, S. (2007) Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships, In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*, pp.47-58.
- Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, M., Tolari, F., Dell'Omodarme, M. & Prati, M. C. (2006) Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *J Med Entomol*, 43(3), pp. 574-579.
- Cani, E., Myrseli, T., Petrela, R., Minarolli, P. & Pano, K. (2001) [Visceral leishmaniasis - a zoonosis with high potential risk in Albania.] in Albanian. *Revista Veterinaria* 5, pp. 81-92.
- Capelli, G., Nardelli, S., di Regalbano, A. F., Scala, A. & Pietrobelli, M. (2004) Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Vet Parasitol*, 123(3-4), pp. 143-148.
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y. & Baneth, G. (2010) Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. *Vet J*, 183(2), pp. 232-233.
- Cardoso, L. s., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G. J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Afonso, M. O., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S. J., Rodrigues, J. & Schallig, H. D. F. H. (2004) Sero-epidemiological study of canine *Leishmania*

spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol*, 121(1-2), pp. 21-32.

Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L. & Sykes, J. E. (2009) Canine granulocytic anaplasmosis: A review. *J Vet Intern Med*, 23(6), pp. 1129-1141.

Casati, S., Sager, H., Gern, L. & Piffaretti, J. C. (2006) Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*, 13(1), pp. 65-70.

Cassini, R., Zanutto, S., Frangipane di Regalbono, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M. P. & Pietrobelli, M. (2009) Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet Parasitol*, 165(1-2), pp. 30-35.

CDC (2013) *Annual cases of anaplasmosis in the United States*. <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/>, (abgerufen am 25.12.2013).

Chambouris, R., Stünzner, D., Sebek, Z., Sixl, W. & Köck, M. (1989) Zur Toxoplasmose der Hunde in Griechenland. *Geogr Med Suppl*, pp. 19-22.

Chang, K.-P. & Fish, W. R. (1983) *Leishmania* In: Jensen, J.B. In vitro cultivation of protozoan parasites, CRC Press, Boca Raton. pp. 111-153.

Chapman, A. S., Bakken, J. S., Folk, S. M., Paddock, C. D., Bloch, K. C., Krusell, A., Sexton, D. J., Buckingham, S. C., Marshall, G. S., Storch, G. A., Dasch, G. A., McQuiston, J. H., Swerdlow, D. L., Dumler, S. J., Nicholson, W. L., Walker, D. H., Eremeeva, M. E. & Ohl, C. A. (2006) Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis-United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep*, 55(Rr-4), pp. 1-27.

Chargui, N., Haouas, N., Gorgii, M., Lahmar, S., Guesmi, M., Ben Abdelhafidh, A., Mezhoud, H. & Babba, H. (2009) Use of PCR, IFAT and in vitro culture in the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. *Parasite*, 16(1), pp. 65-69.

Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. (2009) *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient



transmission. *Vet Res*, 40(2), 37.

Christova, I., Pol, J., Yazar, S., Velo, E. & Schouls, L. (2003) Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species, and Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(9), pp. 535-542.

Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Ambrosio, R., Cortese, L., Persechino, A., Gradoni, L. & Scalone, A. (1997) A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 141(21), pp. 539-543.

climate-data.org (2015) Klima: Albanien. <http://de.climate-data.org/country/68/> (abgerufen am 3.11.2015).

Collantes-Fernandez, E., Gomez-Bautista, M., Miro, G., Alvarez-Garcia, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C. & Ortega-Mora, L. M. (2008) Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet Parasitol*, 152(1-2), pp. 148-151.

Commodaro, A. G., Belfort, R. N., Rizzo, L. V., Muccioli, C., Silveira, C., Burnier Jr, M. N. & Belfort Jr, R. (2009) Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(2), pp. 345-350.

Costa, F. A. L., Goto, H., Saldanha, L. C. B., Silva, S. M. M. S., Sinhorini, I. L., Silva, T. C. & Guerra, J. L. (2003) Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*, 40(6), pp. 677-684.

Courtney, C. H. & Zeng, Q. (2001) Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Vet Parasitol*, 96(4), pp. 317-322.

Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S. & Massung, R. F. (2004) Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, 42(7), pp. 3164-3168.

Cricko, Z., Zanj, S., Kusi, I. & E., C. (1999) [Investigations of canine leishmaniosis in Albania] in Albanian. *Buletini i Shkencave Bujgësore*, 3, pp. 109-113.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Capuano, F., Baldi, L., Veneziano, V. & Capelli, G. (2002)

Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet Parasitol*, 106(4), pp. 307-313.

Cvetkovic, D., Bobic, B., Jankovska, G., Klun, I., Panovski, N. & Djurkovic-Djakovic, O. (2010) Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnant women in FYR of Macedonia. *Parasite*, 17(3), pp. 183-186.

Dantas-Torres, F. (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 149(3-4), pp. 139-146.

Dantas-Torres, F. (2010) Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*, 3, 26.

de Castro, M. B., Machado, R. Z., de Aquino, L. P. C. T., Alessi, A. C. & Costa, M. T. (2004) Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*, 119(1), pp. 73-86.

de Freitas, E., Melo, M. N., da Costa-Val, A. P. & Michalick, M. S. M. (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*, 137(1-2), pp. 159-167.

de Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D. & Bacellar, F. (2006) *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 12(7), pp. 1103-1108.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. & Zahner, H. (2012) *Lehrbuch der Parasitologie für Tiermediziner*, Stuttgart: Enke-Verlag.

Desjeux, P. (2001) The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95(3), pp. 239-243.

Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5), pp. 305-318.

Dhamo, G., Rapti, D., Bizhga, B. & Llazari, A. (2006) [Kërkime hematologjike paraprake mbi babezionën e qenve] in Albanian. *Revista Shqiptare e Shkencave Bujqësore*, 5, pp. 114-119.

Diakou, A. & Kapantaidakis, E. (2014) Epidemiology of dirofilariosis in dogs in Greece: Previous and latest information, Fourth European *Dirofilaria* and

*Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary, p. 44.

Diza, E., Frantzidou, F., Souliou, E., Arvanitidou, M., Gioula, G. & Antoniadis, A. (2005) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in northern Greece during the last 20 years. *Clin Microbiol Infect*, 11(9), pp. 719-723.

Djurkovic-Djakovic, O., Bobic, B. & Klun, I. (2010) Toxoplasmosis in Serbia: time for an action plan. *Parasite*, 17(3), pp. 187-192.

Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F. & Sievers, M. (2009) *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerg Infect Dis*, 15(1), pp. 98-100.

Doudier, B., Olano, J., Parola, P. & Brouqui, P. (2010) Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Vet Parasitol*, 167(2-4), pp. 149-154.

Dubey, J. P. (2010) *Toxoplasmosis of animals and humans*, CRC Press, Boca Raton.

Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L. D., Speer, C. A., Trees, A. J., Uggla, A., Upton, S. J., Williams, D. J. L. & Lindsay, D. S. (2002) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol*, 32(8), pp. 929-946.

Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. & Uggla, A. (1988) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 192(9), pp. 1269-1285.

Dubey, J. P. & Lappin, M. R. (2006) Toxoplasmosis and neosporosis. In: Greene, C.E., Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 754-775.

Dubey, J. P. & Lindsay, D. S. (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67(1-2), pp. 1-59.

Dubey, J. P. & Schares, G. (2011) Neosporosis in animals--the last five years. *Vet Parasitol*, 180(1-2), pp. 90-108.

- Dubey, J. P., Vianna, M. C., Kwok, O. C., Hill, D. E., Miska, K. B., Tuo, W., Velmurugan, G. V., Conors, M. & Jenkins, M. C. (2007) Neosporosis in Beagle dogs: clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol*, 149(3-4), pp. 158-166.
- Duh, D., Petrovec, M. & Avsic-Zupanc, T. (2001) Diversity of *Babesia* infecting european sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol*, 39(9), pp. 3395-3397.
- Duh, D., Petrovec, M., Trilar, T., Punda-Polic, V., Bradaric, N., Klismanic, Z. & Avsic-Zupanc, T. (2003) A follow-up study on newly recognized spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Ann N Y Acad Sci*, 990, pp. 149-151.
- Duh, D., Punda-Polic, V., Avsic-Zupanc, T., Bouyer, D., Walker, D. H., Popov, V. L., Jelovsek, M., Gracner, M., Trilar, T., Bradaric, N., Kurtti, T. J. & Strus, J. (2010) *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 4), pp. 977-984.
- Duh, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strašek, K. & Avšič-Županc, T. (2004) Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet Res*, 35(3), pp. 363-368.
- Dujardin, J. C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbel, Y. & Boelaert, M. (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14(7), pp. 1013-1018.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y. & Rurangirwa, F. R. (2001) Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(6), pp. 2145-2165.
- Dumler, J. S., Kyoung-Seong, C., Garcia-Garcia, J. C., Barat, N. S., Scorpio, D. G., Garyu, J. W., Grab, D. J. & Bakken, J. S. (2005) Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*, 11(12), pp. 1828-1834.
- Duprey, Z. H., Steurer, F. J., Rooney, J. A., Kirchhoff, L. V., Jackson, J. E., Rowton, E. D. & Schantz, P. M. (2006) Canine visceral leishmaniasis, United States and

Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, 12(3), pp. 440-446.

Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H. J., Meyersen, A. & Straubinger, R. K. (2012) First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasit Vectors*, 5, 49.

Ebani, V. V., Bertelloni, F., Turchi, B. & Cerri, D. (2013) Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Ann Agric Environ Med*, 20(2), pp. 289-292.

Eberts, M. D., Vissotto de Paiva Diniz, P. P., Beall, M. J., Stillman, B. A., Chandrashekar, R. & Breitschwerdt, E. B. (2011) Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47(6), pp. 86-94.

ECDC (2015) European centre for disease prevention and control, *Phlebotomine sandflies*, In:.

<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/sanflies/Pages/sandflies.aspx>  
(abgerufen 30.09.2015).

Eddlestone, S. M., Gaunt, S. D., Neer, T. M., Boudreaux, C. M., Gill, A., Haschke, E. & Corstvet, R. E. (2007) PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol*, 115(2), pp. 205-210.

Egenvall, A., Bjöersdorff, A., Lilliehöök, L., Olsson Engvall, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, Å. & Gunnarsson, A. (1998) Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec*, 143(15), pp. 412-417.

Egenvall, A., Bonnett, B. N., Gunnarsson, A., Hedhammar, A., Shoukri, M., Bornstein, S. & Artursson, K. (2000a) Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991-94. *Scand J Infect Dis*, 32(1), pp. 19-25.

Egenvall, A., Lilliehöök, I., Karlstam, E., Bjöersdorff, A., Olsson Engvall, E., Artursson, K., Heldtander, M. & Gunnarsson, A. (2000b) Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec*, 146(7), pp. 186-190.

- Egenvall, A. E., Hedhammar, Å. A. & Bjöersdorff, A. I. (1997) Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec*, 140(9), pp. 222-226.
- Eiras, D. F., Basabe, J., Scodellaro, C. F., Banach, D. B., Matos, M. L., Krimer, A. & Baneth, G. (2007) First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Vet Parasitol*, 149(3-4), pp. 275-279.
- Espejo, E., Alegre, M. D., Font, B., Font, A., Segura, F. & Bella, F. (1993) Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: Seasonal differences. *Eur J Epidemiol*, 9(3), pp. 344-346.
- Ewing, S. A., Buckner, R. G. & Stringer, B. G. (1964) The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia* sp. *J Parasitol*, 50, p. 704.
- Ferreira, E. d. C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A. B., Paes, D. V., Silva, E. S. d., Schallig, H. & Gontijo, C. M. F. (2007) Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*, 146(3-4), pp. 235-241.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J. & Portús, M. (1999) Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83(2), pp. 87-97.
- Fishman, Z., Gonen, L., Harrus, S., Strauss-Ayali, D., King, R. & Baneth, G. (2004) A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Vet Parasitol*, 119(1), pp. 21-26.
- Florea, C. I., Olaru, S., Dobrica, A. & Tudor, P. (2014) Epidemiologically study about natural infestation with *Dirofilaria* in shelters located in the southern part of Romania, Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary, p. 43.
- Foissac, M., Million, M., Mary, C., Dales, J. P., Souraud, J. B., Piarroux, R. & Parola, P. (2013) Subcutaneous infection with *Dirofilaria immitis* nematode in human, France. *Emerg Infect Dis*, 19(1), pp. 171-172.
- Fournier, P. E., Durand, J. P., Rolain, J. M., Camicas, J. L., Tolou, H. & Raoult, D. (2003) Detection of Astrakhan fever rickettsia from ticks in Kosovo. *Ann N Y Acad*

*Sci*, 990, pp. 158-161.

Frank, J. R. & Breitschwerdt, E. B. (1999) A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med*, 13(3), pp. 194-201.

Frenkel, J. K., Lindsay, D. S., Parker, B. B. & Dobesh, M. (2003) Dogs as possible mechanical carriers of *Toxoplasma*, and their fur as a source of infection of young children. *Int J Infect Dis*, 7(4), pp. 292-293.

Frenkel, J. K. & Parker, B. B. (1996) An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii*: The probable importance of xenosmophilia. *Ann N Y Acad Sci*, 791(1), pp. 402-407.

Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I. & Xuan, X. (2005) Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol*, 35(9), pp. 1031-1035.

Galgut, B. I., Janardhan, K. S., Grondin, T. M., Harkin, K. R. & Wight-Carter, M. T. (2010) Detection of *Neospora caninum* tachyzoites in cerebrospinal fluid of a dog following prednisone and cyclosporine therapy. *Vet Clin Pathol*, 39(3), pp. 386-390.

Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R. & Breitschwerdt, E. (2010) Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit Vectors*, 3(1), 33.

Gavazza, A., Bizzeti, M. & Papini, R. (2003) Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy *Rev Méd Vét*, 8-9, pp. 565-571.

Gavgani, A. S. M., Hodjati, M. H., Mohite, H. & Davies, C. R. (2002a) Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched cluster randomised trial. *The Lancet*, 360(9330), pp. 374-379.

Gavgani, A. S. M., Mohite, H., Edrissian, G. H., Mohebali, M. & Davies, C. R. (2002b) Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg*, 67(5), pp. 511-515.

Gaywee, J., Sunyakumthorn, P., Rodkvamtook, W., Ruang-areerate, T., Mason, C. J. & Sirisopana, N. (2007) Human infection with *Rickettsia* sp. related to *R.*

*japonica*, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 13(4), pp. 671-673.

Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G. & Genchi, M. (2011) Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*, 176(4), pp. 295-299.

Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G. (2005) Is heartworm disease really spreading in Europe? *Vet Parasitol*, 133(2-3), pp. 137-148.

Genchi, C., Venco, L. & Genchi, M. (2007) Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*. Rolando Ed, Naples, pp. 137-144.

Georgieva, D., Kirikova, Z. & Ivanov, A. (2001) A study on the incidence and diagnostics of dirofilariosis (heartworm disease) in carnivores. *Bulg J Vet Med*, 4(4), pp. 231-236.

Germanakis, A., Chochlakis, D., Angelakis, E., Tselentis, Y. & Psaroulaki, A. (2013) *Rickettsia aeschlimannii* infection in a man, Greece. *Emerg Infect Dis*, 19(7), pp. 1176-1177.

Germanakis, A., Psaroulaki, A., Gikas, A. & Tselentis, Y. (2006) Mediterranean Spotted Fever in Crete, Greece. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078(1), pp. 263-269.

GHO (2014) Global health observatory data repository: Leishmaniasis: Number of cases of visceral leishmaniasis reported Data by country  
<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>, (abgerufen am 15.08.2014).

Gina, A., Suta, K., Kastrati, B. & Azemi, D. (1975) Shërndarja e riqnave (Familija *Ixodidae*) në vëndin tonë e parë në prizmin e rëndësisë epidemiologjike. 2, pp. 63-71.

Girdan, G. T., Ionita, M. & Mitrea, I. L. (2014) Serological survey on canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection and other vector-borne pathogens in dogs from Bucharest, Romania, Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary, p. 78.



- Gollub, E. L., Leroy, V., Gilbert, R., Chene, G. & Wallon, M. (2008) Effectiveness of health education on *Toxoplasma*-related knowledge, behaviour, and risk of seroconversion in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 136(2), pp. 137-145.
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C. & Zemlicka, D. E. (2004) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 34(2), pp. 159-161.
- Gothé, R. & Hamel, H. D. (1973) Zur Ökologie eines deutschen Stammes von *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 41(2), pp. 157-172.
- Gradoni, L. & Bryceson, A. (1995) Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(2), pp. 191-197.
- Gramiccia, M. (2011) Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, 181(1), pp. 23-30.
- Grandi, G., Živičnjak, T. & Beck, R. (2007) Pathogenesis of *Dirofilaria* spp infections In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections*. Rolando Ed, Naples, pp. 59-66.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Pena, A. & Levin, M. (2013) Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis*, 4(3), pp. 171-180.
- Gray, J., von Stedingk, L. V., Gurtelschmid, M. & Granstrom, M. (2002) Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol*, 40(4), pp. 1259-1263.
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P. & Weiss, L. (2010) Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis*, 1(1), pp. 3-10.
- Greene, C. & Craig, E. (2006) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, St Louis, MO: Elsevier Saunders.
- Greene, C. E. & Breitschwerdt, E. (2006) Rocky mountain spotted fever, murine

typhuslike disease, rickettsialpox, typhus and Q-fever. In: Greene, CE. Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders. 2006:219-224., pp. 232-245.

Greene, C. E., Burgdorfer, W., Cavagnolo, R., Philip, R. N. & Peacock, M. G. (1985) Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 186(5), pp. 465-472.

Greig, B. & Armstrong, P. (2006) Canine granulocytrophic anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum* Infection) In: Greene, CE. Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 219-224.

Groves, M. G., Dennis, G. L., Amyx, H. L. & Huxsoll, D. L. (1975) Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res*, 36(7), pp. 937-940.

Halbig, P., Hodjati, M. H., Mazloumi-Gavani, A. S., Mohite, H. & Davies, C. R. (2000) Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol*, 14(2), pp. 223-226.

Hamel, D., Shukullari, E., Rapti, D., Silaghi, C., Pfister, K. & Rehbein, S. (2015) Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. *Parasitol Res.*, Epub: 2015/10/11

Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S. & Pfister, K. (2009) Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien Klin Wochenschr*, 121 Suppl 3, pp. 42-45.

Hamel, D., Silaghi, C., Lescai, D. & Pfister, K. (2012) Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol Res*, 110(4), pp. 1537-1545.

Hamel, D., Silaghi, C., Shukullari, E., Rapti, D., Pfister, K. & Rehbein, S. (2013) Parasitenbefall und vektor-übertragene Infektionen bei tierärztlich betreuten Hunden in Albanien: Vektor-übertragene und parasitäre Infektionen. *Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und Parasitäre Krankheiten"*, 8-10. Juli 2013, Gießen, pp. 24-25.

Handman, E. & Bullen, D. V. R. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*, 18(8), pp. 332-334.

Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E. & Bark, H. (1997a) Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet Rec*, 141(10), pp. 247-250.

Harrus, S., Kass, P. H., Klement, E. & Waner, T. (1997b) Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec*, 141(14), pp. 360-363.

Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T. & Shaw, S. (2004) Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(11), pp. 4488-4490.

Harrus, S. & Waner, T. (2011) Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J*, 187(3), pp. 292-296.

Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J. E., Poland, A. M. & Bark, H. (1998) Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*, 36(1), pp. 73-76.

Harrus, S., Waner, T., Friedmann-Morvinski, D., Fishman, Z., Bark, H. & Harmelin, A. (2003) Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 96(3-4), pp. 239-243.

Harvey, J. W. (2006) Thrombocytotropic Anaplasmosis (*A.platys* [*E. platys*] infection). In: Greene, C.E., Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 229-231.

Harvey, J. W., Simpson, C. F. & Gaskin, J. M. (1978) Cyclic thrombocytopenia induced by a *Rickettsia*-like agent in dogs. *J Infect Dis*, 137(2), pp. 182-188.

Harvey, J. W., Simpson, C. F., Gaskin, J. M. & Sameck, J. H. (1979) Ehrlichiosis in wolves, dogs, and wolf-dog crosses. *J Am Vet Med Assoc*, 175(9), pp. 901-905.

Hauschild, S. & Schein, E. (1996) Zur Artspezifität von *Babesia canis*. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 109, pp. 216-219.

- Herrero-Herrero, J. I., Ruiz-Beltran, R., Martin-Sanchez, A. M. & Garcia, E. J. (1989) Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. *Acta Trop*, 46(5-6), pp. 335-350.
- Herrero, C., Pelaz, C., Alvar, J., Molina, R., Vazquez, J., Anda, P., Casal, J. & Martin-Bourgon, C. (1992) Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *Eur J Epidemiol*, 8(4), pp. 575-579.
- Hildebrandt, A., Gray, J. S. & Hunfeld, K. P. (2013) Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*, 41(6), pp. 1057-1072.
- Hodzic, A., Alic, A., Fuehrer, H. P., Harl, J., Wille-Piazzai, W. & Duscher, G. G. (2015) A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit Vectors*, 8, 88.
- Holler, D., Racz, A., Bosnir J. & Petrak, O. (2010) The prevalence of dirofilariosis in the hinterland of the Istrian peninsula. *Medica Jadertina*, 40(3-4), pp. 67-74.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., 3rd, Krause, P. J. & Persing, D. H. (2000) Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13(3), pp. 451-469.
- Hornok, S., Edelhofer, R. & Farkas, R. (2006) Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res*, 99(6), pp. 638-642.
- Hornok, S. & Farkas, R. (2009) Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Med Vet Entomol*, 23(1), pp. 41-46.
- Horowitz, H. W., Kilchevsky, E., Haber, S., Aguerro-Rosenfeld, M., Kranwinkel, R., James, E. K., Wong, S. J., Chu, F., Liveris, D. & Schwartz, I. (1998) Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med*, 339(6), pp. 375-378.
- Icen, H., Babur, C., Bademkiran, S., Celebi, B., Simsek, A., Ozyurtlu, N. & Ozkan, A. T. (2010) [Seroprevalance of toxoplasmosis, leishmaniosis and listeriosis in shelter dogs of Diyarbakir, Turkey] in Turkish. *Turkiye Parazitol Derg*, 34(1), pp. 6-10.
- Imre, M., Farkas, R., Ilie, M., Imre, K., Hotea, I., Morariu, S., Morar, D. & Darabus, G. (2013a) Seroprevalence of *Babesia canis* infection in clinically healthy dogs

from western Romania. *J Parasitol*, 99(1), pp. 161-163.

Imre, M., Farkas, R., Ilie, M. S., Imre, K. & Darabus, G. (2013b) Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: occurrence of *Babesia gibsoni* associated with breed. *Ticks Tick Borne Dis*, 4(6), pp. 500-502.

Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K. & Onishi, T. (2002) Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol*, 106(3), pp. 265-271.

Inokuma, H., Raoult, D. & Brouqui, P. (2000) Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol*, 38(11), pp. 4219-4221.

Inokuma, H., Tamura, K. & Onishi, T. (1996) Seasonal occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* in Okayama Prefecture, Japan and effect of temperature on development of the tick. *J Vet Med Sci*, 58(3), pp. 225-228.

Ionita, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D. & Silaghi, C. (2013) Molecular evidence for bacterial and protozoan pathogens in hard ticks from Romania. *Vet Parasitol*, 196(1-2), pp. 71-76.

Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M. P., Galuppi, R. & Cancrini, G. (2010) Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet Parasitol*, 170(3-4), pp. 291-296.

Irwin, P. J. (2009) Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors*, 2 Suppl 1, p.4.

Jažić, A., Zuko, A. & Čanković, M. (1998) Leishmaniasis in dogs in the area of Blagaj (Mostar), Bosnia-Herzegovina. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*, 3(3-4), pp. 59-60.

Jefferies, R., Ryan, U. M., Jardine, J., Robertson, I. D. & Irwin, P. J. (2007) *Babesia gibsoni*: detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Exp Parasitol*, 117(2), pp. 115-123.

Jensen, J., Müller, E. & Dauschies, A. (2003) Für die Reisemedizin bedeutungsvolle arthropodenübertragene Infektionen bei Hunden in Griechenland. *Prakt Tierarzt* 84(6), pp. 430-438.

- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H. M., Soller, J. T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K. & Nolte, I. (2007) *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health*, 54(2), pp. 94-101.
- Kachrimanidou, M., Souliou, E., Pavlidou, V., Antoniadis, A. & Papa, A. (2010) First detection of *Rickettsia slovaca* in Greece. *Exp Appl Acarol*, 50(1), pp. 93-96.
- Kamhawi, S. (2006) *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 22(9), pp. 439-445.
- Karagenc, T. I., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H. B., Ozon, Y. H., Atasoy, A. & Eren, H. (2006) A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Vet Parasitol*, 135(2), pp. 113-119.
- Kero, A. & Xinxo, A. (1998) Epidemiological characteristics of leishmaniasis in Albania in the period 1984-1996. *Giornale di Italiano di Medicina Tropicale*, 3, pp. 55-57.
- Kikuth, W. (1928) Über einen neuen Anämieerreger, *Bartonella canis* nov. spec. *Klinische Wochenschrift*, 7(37), pp. 1729-1730.
- Killick-Kendrick, R. (1999) The biology and control of *Phlebotomine* sand flies. *Clin Dermatol*, 17(3), pp. 279-289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M. P. & Cadiergues, M. C. (1997) Protection of dogs from bites of *phlebotomine* sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11(2), pp. 105-111.
- Kirkova, Z., Ivanov, A. & Georgieva, D. (2007) *Dirofilariosis* in dogs and wild carnivores in Bulgaria In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Zagreb, Ronaldo Editore, p. 204.
- Klun, I., Djurkovic-Djakovic, O., Katic-Radivojevic, S. & Nikolic, A. (2006) Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Vet Parasitol*, 135(2), pp. 121-131.
- Koch, H. G. & Tuck, M. D. (1986) Molting and survival of the brown dog tick (*Acari: Ixodidae*) under different temperatures and humidities. *Ann Entomol Soc*

*Am*, 79(1), pp. 11-14.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P. & Pfister, K. (2008) Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med*, 22(6), pp. 1289-1295.

Kommenou, A. A., Mylonakis, M. E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, E., Dessiris, A., Koutinas, A. F. & Ofri, R. (2007) Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Vet Ophthalmol*, 10(3), pp. 137-142.

Kontos, V. & Koutinas, A. (1990) Canine hepatozoonosis: A review of 11 naturally occurring cases. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 41, pp. 73-81.

Kontos, V. I., Papadopoulos, O. & French, T. W. (1991) Natural and experimental canine infections with a greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet Clin Pathol*, 20(4), pp. 101-105.

Kosic, L. S., Simin, S., Lalosevic, V., Kurcua, L., Nikolic, S. & Nerac, D. (2014) Updating the prevalence of canine dirofilariosis in pet dogs in Novi Sad, Vojvodina, Serbia, Fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary, p. 47.

Kostova, T., Halacheva, M., Marinova, V. & Filipov, G. (1999) Studies on the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in dogs and the role of cats in the distribution of toxoplasmosis. *Bulg. J. Vet. Med.*, 2(4), pp. 191-196.

Koutinas, A., Polizopoulou, Z., Saridomichelakis, M., Argyriadis, D., Fytianou, A. & Plevraki, K. (1999) Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc*, 35(5), pp. 376-383.

Kuruca, L., Spasojevic-Kosic, L., Simin, S., Savovic, M., Laus, S. & Lalosevic, V. (2013) *Neospora caninum* antibodies in dairy cows and domestic dogs from Vojvodina, Serbia. *Parasite*, 20, 40.

Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P. & Bastien, P. (2002) Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp. 210-215.

- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Giannelli, A. & Otranto, D. (2014) Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(6), pp. 943-946.
- Lazri, T., Duscher, G., Edelhofer, R., Bytyci, B., Gjino, P. & Joachim, A. (2008) Infektionen mit arthropodenübertragenen Parasiten bei Hunden im Kosovo und in Albanien unter besonderer Berücksichtigung der Leishmanieninfektionen. *Wien Klin Wochenschr*, 120(4), pp. 54-58.
- Lefkaditis, M., Koukeri, S. & Cozma, V. (2010) An endemic area of *Dirofilaria immitis* seropositive dogs at the eastern foothills of Mt Olympus, Northern Greece. *Helminthologia*, 47, pp. 3-7.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R. & Killick-Kendrick, M. (1988) Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82(3), pp. 419-420.
- Levin, M. L., Killmaster, L. F. & Zemtsova, G. E. (2012) Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(1), pp. 28-33.
- Lewis, G. E., Jr., Ristic, M., Smith, R. D., Lincoln, T. & Stephenson, E. H. (1977) The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res*, 38(12), pp. 1953-1955.
- Liao, M., Xuan, X., Huang, X., Shirafuji, H., Fukumoto, S., Hirata, H., Suzuki, H. & Fujisaki, K. (2005) Identification and characterization of cross-reactive antigens from *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 130(05), pp. 481-488.
- Lima, M. L., Soares, P. T., Ramos, C. A., Araujo, F. R., Ramos, R. A., Souza, II, Faustino, M. A. & Alves, L. C. (2010) Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. *Braz J Microbiol*, 41(2), pp. 381-385.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Butler, J. M. & Blagburn, B. L. (1997) Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. *Vet Parasitol*, 73(1-2), pp. 27-33.
- Lito, G., Davachi, F., Sulcebe, G., Bregu, H. & Basha, M. (2002) Pediatric visceral



leishmaniasis in Albania. *Int J Infect Dis*, 6(1), pp. 66-68.

Lopes, M. G., Mendonca, I. L., Fortes, K. P., Amaku, M., Pena Hde, F. & Gennari, S. M. (2011) Presence of antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* in dogs from Piauí. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20(2), pp. 111-114.

Lotric-Furlan, S., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T. & Strle, F. (2003) Human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Ann N Y Acad Sci*, 990, pp. 279-284.

Luli, M. (1963) Rriqnat e familjes *Ixodidae* që parazitonjë në kafshët shtëpijake në Shqipëri. *Buletini i Shkencave Bujqësore*, 2(1), pp. 108-137.

MacLeod, J. & Gordon, W. S. (1933) Studies on tick-borne fever in sheep. I. Transmission by the tick *Ixodes ricinus* and description of the disease produced. *Parasitology*, 25, pp. 273-283.

Maggi, P., Volpe, A., Carito, V., Schinaia, N., Bino, S., Basho, M. & Denticò, P. (2009) Surveillance of toxoplasmosis in pregnant women in Albania. *New Microbiol*, 32(1), pp. 89-92.

Maggi, R. G., Compton, S. M., Trull, C. L., Mascarelli, P. E., Mozayeni, B. R. & Breitschwerdt, E. B. (2013a) Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. *J Clin Microbiol*, 51(10), pp. 3237-3241.

Maggi, R. G., Mascarelli, P. E., Havenga, L. N., Naidoo, V. & Breitschwerdt, E. B. (2013b) Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit Vectors*, 6, 103.

Magi, M., Calderini, P., Gabrielli, S., Dell'Omodarme, M., Macchioni, F., Prati, M. C. & Cancrini, G. (2008) *Vulpes vulpes*: a possible wild reservoir for zoonotic filariae. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8(2), pp. 249-252.

Maia, C. & Campino, L. (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158(4), pp. 274-287.

Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Gonçalves, L. & Campino, L. (2009) Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*, 179(1), pp. 142-144.

- Manfredi, M. T., Di Cerbo, A. & Genchi, C. (2007) Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections. Rolando Ed, Naples*, pp. 39-46.
- Manna, L., Paciello, O., Morte, R. D. & Gravino, A. E. (2012) Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors*, 5, pp. 216.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L. M. & Gravino, A. E. (2008) Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 177(2), pp. 279-282.
- Mannelli, A., Mandola, M. L., Pedri, P., Tripoli, M. & Nebbia, P. (2003) Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Prev Vet Med*, 60(1), pp. 13-26.
- Maroli, M., Mizzoni, V., Siragusa, C., D'Orazi, A. & Gradoni, L. (2001) Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol*, 15(4), pp. 358-363.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (2007) Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 145(3-4), pp. 357-360.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M. & Gradoni, L. (2008) The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and *phlebotomine* vectors. *Trop Med Int Health*, 13(2), pp. 256-264.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L. & Dumon, H. (2004) Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*, 42(11), pp. 5249-5255.
- Mathe, A., Dobos-Kovacs, M. & Voros, K. (2007) Histological and ultrastructural studies of renal lesions in *Babesia canis* infected dogs treated with imidocarb. *Acta Vet Hung*, 55(4), pp. 511-523.

- Mathe, A., Voros, K., Papp, L. & Reiczigel, J. (2006) Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung*, 54(3), pp. 367-385.
- McAllister, M. M. (2005) A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. *Vet Parasitol*, 132(3-4), pp. 241-247.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A. & McGuire, A. M. (1998) Rapid communication: dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*, 28(9), pp. 1473-1479.
- McAllister, M. M., Parmley, S. F., Weiss, L. M., Welch, V. J. & McGuire, A. M. (1996) An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen. *J Parasitol*, 82(2), pp. 354-355.
- McCann, C. M., Vyse, A. J., Salmon, R. L., Thomas, D., Williams, D. J., McGarry, J. W., Pebody, R. & Trees, A. J. (2008) Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. *Emerg Infect Dis*, 14(6), pp. 978-980.
- McGarry, H. F., Egerton, G. L. & Taylor, M. J. (2004) Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol*, 135(1), pp. 57-67.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Pena, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G., Jensen, J. K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H. & Van Bortel, W. (2013) Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*, 6, 1.
- Meinkoth, J. H., Kocan, A. A., Loud, S. D. & Lorenz, M. D. (2002) Clinical and hematologic effects of experimental infection of dogs with recently identified *Babesia gibsoni*-like isolates from Oklahoma. *J Am Vet Med Assoc*, 220(2), pp. 185-189.
- Mekuzas, Y., Gradoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, V. & Baneth, G. (2009) *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2, pp. 30-31.

- Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C. & Raoult, D. (2014) Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infect Genet Evol*, 25, pp. 122-137.
- Messick, J. B. (2003) New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33(6), pp. 1453-1465.
- Messick, J. B., Walker, P. G., Raphael, W., Berent, L. & Shi, X. (2002) 'Candidatus *mycoplasma haemodidelphidis*' sp. nov., 'Candidatus *mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(3), pp. 693-698.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. & Deplazes, P. (2005) Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol*, 43(11), pp. 5515-5519.
- Mierzejewska, E., Rodo, A. & Welc-Faleciak, R. (2012) Evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of central asian sheperd pups- a case study. *In: Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, pp. 286.
- Millan, J., Ferroglio, E. & Solano-Gallego, L. (2014) Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res*, 113(6), pp. 2005-2014.
- Mircean, V., Dumitrache, M. O., Gyorke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A. D. & Cozma, V. (2012) Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(7), pp. 595-604.
- Misic-Majerus, L., Bujic, N., Madjaric, V. & Janes-Poje, V. (2000) Abstracts: Topic 12 - Emerging infections. *Clin Microbiol Infect*, 6, p. 194.
- Mitreă, I. L., Enăchescu, V. & Ionita, M. (2013) *Neospora caninum* infection in dogs from Southern Romania: coproparasitological study and serological follow-

up. *J Parasitol*, 99(2), pp. 365-367.

Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. & Bernal, J. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*, 190(1–2), pp. 268-271.

Montarsi, F., Ciocchetta, S., Devine, G., Ravagnan, S., Mutinelli, F., Frangipane di Regalbono, A., Otranto, D. & Capelli, G. (2015) Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasit Vectors*, 8, 177.

Montoya-Alonso, J. A., Carretón, E., Corbera, J. A., Juste, M. C., Mellado, I., Morchón, R. & Simón, F. (2011) Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Vet Parasitol*, 176(4), pp. 291-294.

Montoya, J. A., Morales, M., Juste, M. C., Bañares, A., Simon, F. & Genchi, C. (2006) Seroprevalence of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) on Tenerife Island: an epidemiological update. *Parasitol Res*, 100(1), pp. 103-105.

Morchón, R., Carretón, E., González Miguel, J. & Mellado Hernández, I. (2012) Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe. New distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3, 196.

Mumcuoglu, K. Y., Frish, K., Sarov, B., Manor, E., Gross, E., Gat, Z. & Galun, R. (1993) Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae. *J Med Entomol*, 30(1), pp. 114-121.

Murata, T., Inoue, M., Tateyama, S., Taura, Y. & Nakama, S. (1993a) Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J Vet Med Sci*, 55(5), pp. 867-868.

Murata, T., Shimoda, K., Inoue, M., Shiramizu, K., Kanoe, M., Taura, Y. & Nakama, S. (1993b) Seasonal periodical appearance of *Hepatozoon canis* gamont in the peripheral blood. *J Vet Med Sci*, 55(5), pp. 877-879.

Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Billinis, C., Leontides, L. S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T. & Fytianou, A. (2003) Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Vet Microbiol*, 91(2-3), pp. 197-204.

- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., Billinis, C. D., Leontides, L. S. & Kontos, V. S. (2004) Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc*, 40(3), pp. 174-184.
- Mylonakis, M. E., Leontides, L., Gonen, L., Billinis, C., Koutinas, A. F. & Baneth, G. (2005) Anti-*Hepatozoon canis* serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet Parasitol*, 129(3-4), pp. 229-233.
- Naucke, T. J. & Lorentz, S. (2012) First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5, 67.
- Neer, T. M. & Harrus, S. (2006) Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: Greene, C.E., Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 203-216.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y. & Tully, J. G. (2001) Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(3), pp. 891-899.
- Nelson, C. T., McCall, J. W., Rubin, S. B., Buzhardt, L. F., Dorion, D. W., Graham, W., Longhofer, S. L., Guerrero, J., Robertson-Plouch, C. & Paul, A. (2005) 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Vet Parasitol*, 133(2-3), pp. 255-266.
- Nishikawa, Y., Claveria, F. G., Fujisaki, K. & Nagasawa, H. (2002) Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni*. *J Vet Med Sci*, 64(2), pp. 161-164.
- Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapico, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2010) Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet Microbiol*, 142(3-4), pp. 276-284.
- Nyindo, M., Huxsoll, D. L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J. L., Carson, C. A. &

- Stephenson, E. H. (1980) Cell-mediated and humoral immune responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *Am J Vet Res*, 41(2), pp. 250-254.
- Ogden, N. H., Bown, K., Horrocks, B. K., Woldehiwet, Z. & Bennett, M. (1998) Granulocytic Ehrlichia infection in *Ixodid* ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol*, 12(4), pp. 423-429.
- Ogden, N. H., Casey, A. N., Woldehiwet, Z. & French, N. P. (2003) Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infect Immun*, 71(4), pp. 2071-2078.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T. & Gradoni, L. (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44(4), pp. 1318-1322.
- Omeragic, J. (2011) Ixodid ticks in Bosnia and Herzegovina. *Exp Appl Acarol*, 53(3), pp. 301-309.
- Ortuño, A., Pons, I., Nogueras, M. M., Castellà, J. & Segura, F. (2009) The dog as an epidemiological marker of *Rickettsia conorii* infection. *Clin Microbiol Infect*, 15, pp. 241-242.
- Oteo, J. A. & Portillo, A. (2012) Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis*, 3(5–6), pp. 271-278.
- Otranto, D., Capelli, G. & Genchi, C. (2009a) Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit Vectors*, 2 Suppl 1, p. 2.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E. B. (2009b) Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol*, 25(5), pp. 228-235.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R. P., Latrofa, M. S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G. & Stanneck, D. (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, 144(3–4), pp. 270-278.

- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Diniz, P. P., de Caprariis, D., Lia, R. P., Mencke, N., Stanneck, D., Capelli, G. & Breitschwerdt, E. B. (2010) Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. *J Clin Microbiol*, 48(9), pp. 3316-3324.
- Pampiglione, S., Rivasi, F. & Gustinelli, A. (2009) Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology*, 54(2), pp. 192-204.
- Pantchev, N., Schnyder, M., Vrhovec, M. G., Schaper, R. & Tsachev, I. (2015) Current surveys of the seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Bulgaria. *Parasitol Res*, 114 Suppl 1, pp. 117-130.
- Papadopoulos, B., Perie, N. M. & Uilenberg, G. (1996) Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross-reactions. *Vet Parasitol*, 63(1-2), pp. 41-56.
- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C. & Antoniadis, G. (2005) Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect*, 50(1), pp. 53-60.
- Papazahariadou, M. G., Koutinas, A. F., Rallis, T. S. & Haralabidis, S. T. (1994) Prevalence of microfilaraemia in episodic weakness and clinically normal dogs belonging to hunting breeds. *J Helminthol*, 68(03), pp. 243-245.
- Parola, P., Paddock, C. D. & Raoult, D. (2005) Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), pp. 719-756.
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E. & Raoult, D. (2013) Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), pp. 657-702.
- Paulan Sde, C., Lins, A. G., Tenorio Mda, S., Silva, D. T., Pena, H. F., Machado, R. Z., Gennari, S. M. & Buzetti, W. A. (2013) Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(1), pp. 162-166.



- Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J. & Rosef, O. (2012) Molecular detection and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35(2), pp. 187-195.
- Pavlovic, I., Milojkovic, N., Curcin, L., Kovacevic, M., Novak, N. & Ivanovic, O. (2012a) Prevalence of ehrlichiosis, anaplasmosis and borreliosis in dogs in Serbia. *In: Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, p. 330.
- Pavlovic, I., Terzi, V., Stankovic, B., Petkovic, D., Curcin, P., Antic, V., Terzin, D. & Curcin, K. (2014) Prevalence of *Dirofilaria immitis* in pet and stray dogs in Belgrade area in period 2012-2013, fourth European *Dirofilaria* and *Angiostrongylus* Days (FEDAD), 2-4 July, Budapest, Hungary. p. 77.
- Pavlovic, I., Terzin, V., Pavlovic, M., Petkovic, D., Terzin, D. & Stankovic, B. (2012b) Babesiosis of dogs in Belgrade area between 2009-2011. *In: Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, p. 329.
- Penezic, A., Selakovic, S., Pavlovic, I. & Cirovic, D. (2014) First findings and prevalence of adult heartworms (*Dirofilaria immitis*) in wild carnivores from Serbia. *Parasitol Res*, 113(9), pp. 3281-3285.
- Pennisi, M. G., Capri, A., Solano-Gallego, L., Lombardo, G., Torina, A. & Masucci, M. (2012) Prevalence of antibodies against *Rickettsia conorii*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* antigens in dogs from the Stretto di Messina area (Italy). *Ticks Tick Borne Dis*, 3(5-6), pp. 315-318.
- Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q. & Rikihisa, Y. (2006) Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, pp. 110-117.
- Perez, M., Rikihisa, Y. & Wen, B. (1996) *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol*, 34(9), pp. 2133-2139.
- Petrela, R., Kuneshka, L., Foto, E., Zavalani, F. & Gradoni, L. (2010) Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: A retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995–2009). *PLoS Negl Trop Dis*, 4(9), e814.
- Petrovec, M., Lotric Furlan, S., Zupanc, T. A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V. & Dumler, J. S. (1997) Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia*

- species. *J Clin Microbiol*, 35(6), pp. 1556-1559.
- Plier, M. L., Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C. & Kidd, L. B. (2009) Lack of evidence for perinatal transmission of canine granulocytic anaplasmosis from a bitch to her offspring. *J Am Anim Hosp Assoc*, 45(5), pp. 232-238.
- Poitout, F. M., Shinozaki, J. K., Stockwell, P. J., Holland, C. J. & Shukla, S. K. (2005) Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in western Washington state. *J Clin Microbiol*, 43(2), pp. 796-801.
- Polizopoulou, Z. S., Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N., Patsikas, M. N., Leontidis, L. S., Roubies, N. A. & Desiris, A. K. (2000) Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece. *Vet Rec*, 146(16), pp. 466-469.
- Potkonjak, A., Savić, S., Juric, A., Petrovic, A., Suvajdzic, L., Laka, B., Milosevic, N. & Novakovic, Z. (2013) Seroepidemiological research of canine monocytic ehrlichiosis in the autonomous province of Vojvodina, Serbia. *Acta Scientiae Veterinariae*, 41, pp. 1-6.
- Pozgain, Z., Dulic, G., Sego, K. & Blazekovic, R. (2014) Live *Dirofilaria immitis* found during coronary artery bypass grafting procedure. *Eur J Cardiothorac Surg*, 46(1), pp. 134-136.
- Pozio, E., Maroli, M., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (1985) Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 79(4), pp. 524-526.
- Psaroulaki, A., Germanakis, A., Gikas, A., Scoulica, E. & Tselentis, Y. (2005a) First isolation and genotypic identification of *Rickettsia conorii* Malish 7 from a patient in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24(4), pp. 297-298.
- Psaroulaki, A., Germanakis, A., Gikas, A., Scoulica, E. & Tselentis, Y. (2005b) Simultaneous detection of "*Rickettsia mongolotimonae*" in a patient and in a tick in Greece. *J Clin Microbiol*, 43(7), pp. 3558-3559.
- Psaroulaki, A., Koliou, M., Chochlakis, D., Ioannou, I., Mazeri, S. & Tselentis, Y. (2008) *Anaplasma phagocytophilum* infection in a child. *Pediatr Infect Dis J*, 27(7), pp. 664-666.
- Psaroulaki, A., Ragiadakou, D., Kouris, G., Papadopoulos, B., Chaniotis, B. &

- Tselentis, Y. (2006) Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci*, 1078, pp. 389-399.
- Psaroulaki, A., Spyridaki, I., Ioannidis, A., Babalis, T., Gikas, A. & Tselentis, Y. (2003) First isolation and identification of *Rickettsia conorii* from ticks collected in the region of Fokida in Central Greece. *J Clin Microbiol*, 41(7), pp. 3317-3319.
- Punda-Polić, V., Bradarić, N., Klišmanić-Nuber, Z., Mrljak, V. & Giljanović, M. (1995) Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs in Croatia. *Eur J Epidemiol*, 11(4), pp. 389-392.
- Punda-Polic, V., Petrovec, M., Trilar, T., Duh, D., Bradaric, N., Klismanic, Z. & Avsic-Zupanc, T. (2002) Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp Appl Acarol*, 28(1-4), pp. 169-176.
- Punda-Polic, V., Tonkic, M. & Capkun, V. (2000) Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in the female population of the county of Split Dalmatia, Croatia. *Eur J Epidemiol*, 16(9), pp. 875-877.
- Pusterla, N., Braun, U., Wolfensberger, C. & Lutz, H. (1997) Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow. *Veterinary Record*, 141(4), pp. 101-102.
- Radulovic, Z., Chochlakis, D., Tomanovic, S., Milutinovic, M., Tselentis, Y. & Psaroulaki, A. (2011) First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(2), pp. 111-115.
- Raoult, D. & Parola, P. (2007) Rickettsial Diseases. *CRC Press* p. 29.
- Raoult, D. & Roux, V. (1997) Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 10(4), pp. 694-719.
- Rapti, D. & Rehbein, S. (2010) Seroprevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Albania. *Parasitol Res*, 107(2), pp. 481-485.
- Rasmussen, K. & Jensen, A. L. (1996) Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark. *Vet Parasitol*, 62(3-4), pp. 345-349.
- Ravnik, U., Bajuk, B. P., Lusa, L. & Tozon, N. (2014) Serum protein profiles, circulating immune complexes and proteinuria in dogs naturally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Microbiol*, 173(1-2), pp. 160-165.

- Rea, L. M. & Parker, R. A. (2005) *Designing and conducting survey research a comprehensive guide*, San Francisco, CA: Jossey-Bass, pp. 188-189.
- Ready, P. D. (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, 15(10), 19505.
- Rikihisa, Y. (1991) The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev*, 4(3), pp. 286-308.
- Rosypal, A. C. & Lindsay, D. S. (2005) The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol*, 21(10), pp. 439-440.
- Rovero, C., Brouqui, P. & Raoult, D. (2008) Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerg Infect Dis*, 14(9), pp. 1360-1367.
- Sainz, A., Roura, X., Miro, G., Estrada-Pena, A., Kohn, B., Harrus, S. & Solano-Gallego, L. (2015) Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors*, 8, 75.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C. & Bacellar, F. (2011) The hard-tick fauna of mainland Portugal (*Acari: Ixodidae*): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol*, 55(1), pp. 85-121.
- Santos, A. S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M. S., Bacellar, F. & Dumler, J. S. (2009) Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec*, 164(6), pp. 168-171.
- Sardelic, S., Fournier, P. E., Punda Polic, V., Bradaric, N., Grgic, D., Ivic, I., Ledina, D., Luksic, B., Milas, I. & Raoult, D. (2003) First isolation of *Rickettsia conorii* from human blood in Croatia. *Croat. Med. J.*, 44(5), pp. 630-634.
- Savić, S., Vidic, B., Gric, Z., Gioia, B. & Gradoni, L. (2013) Serological and clinical evidence of leishmaniosis in a dog population living in a farm in northern Serbia. *International Scivac Congress, Canine leishmaniosis and vector-borne diseases: Our current state of knowledge, march 8th-10th, Pisa, Italy*, pp. 120-122.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A. O., Bauer, C. & Conraths, F. J. (2005) Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int J*

*Parasitol*, 35(14), pp. 1525-1537.

Schein, E., Mehlhorn, H. & Voigt, W. P. (1979) Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (*Sporozoa*) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Trop*, 36(3), pp. 229-241.

Schnyder, M. & Deplazes, P. (2012) Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasit Vectors*, 5, 258.

Segura-Porta, F., Diestre-Ortin, G., Ortuño-Romero, A., Sanfeliu-Sala, I., Font-Creus, B., Muñoz-Espin, T., de Antonio, E. & Casal-Fábrega, J. (1998) Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of mediterranean spotted fever in Catalonia, Spain. *Eur J Epidemiol*, 14(4), pp. 395-398.

Seneviratna, P., Weerasinghe & Ariyadasa, S. (1973) Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Res Vet Sci*, 14(1), pp. 112-114.

Sharifdini, M., Mohebbi, M., Keshavarz, H., Hosseini, M., Hajjarian, H., Akhoundi, B., Foroushani, A. R., Zarei, Z. & Charehdar, S. (2011) Neospora caninum and Leishmania infantum Co-Infection in Domestic Dogs (Canis familiaris) in Meshkin-Shahr District, Northwestern Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis*, 5(2), pp. 60-68.

Sibalic, D. (1977) Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in man and in various animals in some areas of Serbia. *Acta Parasitologica Jugoslavica*, 8(1), pp. 13-18.

Sieber, M. (2008) Die Ermittlung von Risikofaktoren. *Praxis*, 97, pp. 779-783.

Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Kusi, I., Shukullari, E., Hamel, D., Pfister, K. & Rehbein, S. (2014) Survey of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*, haemotropic mycoplasmas and other arthropod-borne pathogens in cats from Albania. *Parasit Vectors*, 7, pp. 62.

Silaghi, C., Knaus, M., Rapti, D., Shukullari, E., Pfister, K. & Rehbein, S. (2012) *Rickettsia felis* and *Bartonella* spp. in fleas from cats in Albania. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(1), pp. 76-77.

Silva, D. A., Lobato, J., Mineo, T. W. & Mineo, J. R. (2007) Evaluation of

serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*, 143(3-4), pp. 234-244.

Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. & Montoya-Alonso, J. A. (2012) Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*, 25(3), pp. 507-544.

Simpson, R. M., Gaunt, S. D., Hair, J. A., Kocan, K. M., Henk, W. G. & Casey, H. W. (1991) Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res*, 52(9), pp. 1537-1541.

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G. & Genchi, C. (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol*, 74(2), pp. 223-227.

Sobrino, R., Millán, J., Oleaga, Á., Gortázar, C., de la Fuente, J. & Ruiz-Fons, F. (2012) Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (*Acari: Ixodidae*) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol*, 184(2-4), pp. 248-257.

Socolovschi, C., Bitam, I., Raoult, D. & Parola, P. (2009) Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 2, pp. 319-321.

Solano-Gallego, L. & Baneth, G. (2011) Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*, 181(1), pp. 48-60.

Solano-Gallego, L., Capri, A., Pennisi, M. G., Caldin, M., Furlanello, T. & Trotta, M. (2015) Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasit Vectors*, 8, 216.

Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A. & Ferrer, L. (2004) Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Path*, 130(1), pp. 7-12.

Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T. & Breitschwerdt, E. (2006a) Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg Infect Dis*, 12(12), pp. 1985-1988.

- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 165(1-2), pp. 1-18.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B. & Breitschwerdt, E. (2006b) A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res*, 37(2), pp. 231-244.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008a) Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy. *Zoonoses Public Health*, 55(8-10), pp. 521-525.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M. & Furlanello, T. (2008b) *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol*, 157(3-4), pp. 211-221.
- Song, K. H., Lee, S. E., Hayasaki, M., Shiramizu, K., Kim, D. H. & Cho, K. W. (2003) Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. *Vet Parasitol*, 114(3), pp. 231-236.
- Sotiraki, S., Brozos, C., Samartzi, F., Schares, G., Kiossis, E. & Conraths, F. J. (2008) *Neospora caninum* infection in Greek dairy cattle herds detected by two antibody assays in individual milk samples. *Vet Parasitol*, 152(1-2), pp. 79-84.
- Stefanovska, J., Farkas, R. & Kochevski, R. (2012) Prevalence of some vector borne diseases in dogs in R. Macedonia. In: *Program & Abstract Book EMOP XI, 25-29 July 2012, Cluj, Romania*, pp. 328-329.
- Stegeman, J. R., Birkenheuer, A. J., Kruger, J. M. & Breitschwerdt, E. B. (2003) Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 222(7), pp. 959-963, 952.
- Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R. & Jittapalapong, S. (2008) Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol*, 158(4), pp. 256-273.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C. L., Burshtain, O., Gonen, L. & Baneth, G. (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection

- of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, 189(9), pp. 1729-1733.
- Stuen, S., Granquist, E. G. & Silaghi, C. (2013) *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 31.
- Supakorndej, P., McCall, J. W. & Jun, J. J. (1994) Early migration and development of *Dirofilaria immitis* in the ferret, *Mustela putorius furo*. *J Parasitol*, 80(2), pp. 237-244.
- Sykes, J. E., Bailiff, N. L., Ball, L. M., Foreman, O., George, J. W. & Fry, M. M. (2004) Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*, 224(12), pp. 1946-1951.
- Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L. & Fry, M. M. (2005) 'Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(1), pp. 27-30.
- Taboada, J. & Lobetti, R. (2006) Babesiosis. In: Greene, CE. Craig, E., *Infection Diseases of dogs and cats*, St Louis, MO: Elsevier Saunders, pp. 722-736.
- Tarantino, C., Rossi, G., Kramer, L. H., Perrucci, S., Cringoli, G. & Macchioni, G. (2001) *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. *Vet Parasitol*, 102(1-2), pp. 77-83.
- Tasic-Otasevic, S. A., Trenkic Bozinovic, M. S., Gabrielli, S. V. & Genchi, C. (2015) Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula. *Vet Parasitol*, 209(3-4), pp. 151-156.
- Tasić, A., Rossi, L., Tasić, S., Miladinović-Tasić, N., Ilić, T. & Dimitrijević, S. (2008) Survey of canine dirofilariasis in Vojvodina, Serbia. *Parasitol Res*, 103(6), pp. 1297-1302.
- Tasic, A., Tasic-Otasevic, S., Gabrielli, S., Miladinovic-Tasic, N., Ignjatovic, A., Dordevic, J., Dimitrijevic, S. & Cancrini, G. (2012) Canine dirofilaria infections in two uninvestigated areas of serbia: epidemiological and genetic aspects. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(12), pp. 1031-1035.
- Teglas, M., Matern, E., Lein, S., Foley, P., Mahan, S. M. & Foley, J. (2005) Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol*, 131(1-2), pp. 119-127.



- Tennant, K. V., Barker, E. N., Polizopoulou, Z., Helps, C. R. & Tasker, S. (2011) Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of haemoplasmas in healthy and unhealthy dogs from Central Macedonia, Greece. *J Small Anim Pract*, 52(12), pp. 645-649.
- Tesouro, M. A., Bacellar, F., Sainz, A. & Filipe, A. (1998) Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs. *Ann N Y Acad Sci*, 849(1), pp. 441-443.
- Tomanovic, S., Chochlakis, D., Radulovic, Z., Milutinovic, M., Cakic, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y. & Psaroulaki, A. (2013) Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp Appl Acarol*, 59(3), pp. 367-376.
- Travi, B. L., Osorio, Y., Melby, P. C., Chandrasekar, B., Arteaga, L. & Saravia, N. G. (2002) Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun*, 70(5), pp. 2288-2296.
- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2009a) Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet Parasitol*, 165(3-4), pp. 318-322.
- Trotta, M., Fogliazza, A., Furlanello, T. & Solano-Gallego, L. (2009b) A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. *Clin Microbiol Infect*, 15, pp. 62-63.
- Trotz-William, L. A. & Trees, A. J. (2003) Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet Rec*, 152(4), pp. 97-105.
- Tsachev, I., E.I., P., Kontos, V., Ivanov, A., Chakarova, B., Stojanchev, K. & Peshev, R. (2007) Seroepidemiology of *Leishmania* among healthy dogs in Bulgaria. *Turk J Vet Anim Sci*, 31(1), pp. 73-74.
- Tsachev, I., Ivanov, A., Dinev, I., Simeonova, G. & Kanakov, D. (2008a) Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. *Rev Med Vet*, 159, pp. 68-73.
- Tsachev, I., Kontos, V., I., Z. & Krastev, S. (2006a) Survey of antibodies reactive with *Ehrlichia canis* among dogs in South Bulgaria. *Rev Méd Vét*, 157(10), pp. 481-

485.

Tsachev, I., Papadogiannakis, E. I., Kontos, V., Zarkov, I., V, P. & Pelagic, V. (2006b) Seroprevalence of *Ehrlichia canis* infection among privately-owned dogs in Bulgaria. *J Hell Vet Soc*, 57(3), pp. 212-216.

Tsachev, I., Petrov, V., Flaming, G. & Brown, C. (2008b) First detected case of *Anaplasma phagocytophilum* in a dog in Bulgaria. *Rev Méd Vét*, 159(11), pp. 562-564.

Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perie, N. M. & Spanjer, A. A. (1989) Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q*, 11(1), pp. 33-40.

Vaclavek, P., Sedlak, K., Hurkova, L., Vodrazka, P., Sebesta, R. & Koudela, B. (2007) Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and a long-term study of dynamics of antibodies. *Vet Parasitol*, 143(1), pp. 35-41.

Valenciano, M., Pointo, A., Coulombier, D., Hashorva, E. & Murthi, E. (1999 ) Surveillance of communicable diseases among Kosovar refugees in Albania. *Euro Surveill* 4, pp. 92-95.

van Heerden, J. (1982) A retrospective study on 120 natural cases of canine ehrlichiosis. *J S Afr Vet Assoc*, 53(1), pp. 17-22.

Velo, E., Bino, S., Kuli-Lito, G., Pano, K., Gradoni, L. & Maroli, M. (2003) Recrudescence of visceral leishmaniasis in Albania: retrospective analysis of cases during 1997 to 2001 and results of an entomological survey carried out during 2001 in some districts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97(3), pp. 288-290.

Velo, E., Paparisto, A., Bongiorno, G., Di Muccio, T., Khoury, C., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Maroli, M. (2005) Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. *Parasite*, 12(1), pp. 45-49.

Venco, L. (2007) Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds) *Mappe Parassitologiche 8: Dirofilaria immitis and D. repens* in dog and cat and human infections. *Rolando Ed, Naples*, pp. 123-132.

Vercammen, F., De Deken, R. & Maes, L. (1995) Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using

the IFAT. *Parasite*, 2, pp. 407-410.

Vojta, L., Mrljak, V., Curkovic, S., Zivicnjak, T., Marinculic, A. & Beck, R. (2009) Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *Int J Parasitol*, 39(10), pp. 1129-1136.

Wächter, M., Pfeffer, M., Schulz, N., Balling, A., Chirek, A., Bach, J. P., Moritz, A., Kohn, B., Pachnicke, S. & Silaghi, C. (2015) Seroprevalence of spotted fever group Rickettsiae in dogs in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 15(3), pp. 191-194.

Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y. & Keysary, A. (1997) Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol*, 69(3-4), pp. 307-317.

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A. & Cornelissen, A. W. C. A. (2001) Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet Parasitol*, 95(1), pp. 1-15.

Waner, T., Strenger, C., Keysary, A. & Harrus, S. (1998) Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 66(3-4), pp. 237-243.

Wang, J. Y., Ha, Y., Gao, C. H., Wang, Y., Yang, Y. T. & Chen, H. T. (2011) The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in western China detected by PCR and serological tests. *Parasit Vectors*, 4, 69.

Watanabe, M., Hisasue, M., Hashizaki, K., Furuichi, M., Ogata, M., Hisamatsu, S., Ogi, E., Hasegawa, M., Tsuchiya, R. & Yamada, T. (2003) Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific Polymerase Chain Reaction (SS-PCR). *J Vet Med Sci*, 65(10), pp. 1111-1114.

Wengi, N., Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Riond, B., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2008) Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol*, 126(1-3), pp. 132-141.

- Willi, B., Novacco, M., Meli, L., Wolf-Jäckel, A., Boretti, S., Wengi, N., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2010) Haemotrope Mykoplasmen bei Hund und Katze: Übertragung, Diagnose, Prävalenz und Bedeutung in Europa. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 152(5), pp. 237-244.
- Wojcik-Fatla, A., Cisak, E., Zajac, V., Sroka, J., Sawczyn, A. & Dutkiewicz, J. (2013) Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. I. Prevalence in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae). *Ann Agric Environ Med*, 20(2), pp. 276-279.
- Wojcik-Fatla, A., Zajac, V., Sawczyn, A., Cisak, E. & Dutkiewicz, J. (2015) *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitol Res.*, pp. 3111-3116.
- Woldehiwet, Z. (2008) Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J*, 175(1), pp. 37-44.
- Woldehiwet, Z. (2010) The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*, 167(2-4), pp. 108-122.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A. M., van Maanen, C. & Brinkhof, J. M. (1999) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol*, 29(10), pp. 1677-1682.
- Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Visser, M., Knaus, M., Lindner, T. & Rehbein, S. (2009) Ectoparasites of dogs and cats in Albania. *Parasitol Res*, 105(6), pp. 1577-1587.
- Yamane, I., Thomford, J. W., Gardner, I. A., Dubey, J. P., Levy, M. & Conrad, P. A. (1993) Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Am J Vet Res*, 54(10), pp. 1579-1584.
- Yildirim, A., Ica, A., Atalay, O., Duzlu, O. & Inci, A. (2007) Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Res Vet Sci*, 82(3), pp. 358-363.
- Yildiz, K., Yasa Duru, S., Yagci, B. B., Babur, C., Ocal, N., Gurcan, S. & Karaca, S. (2009) Seroprevalence of *Neospora caninum* and coexistence with *Toxoplasma gondii* in dogs. *Turkiye Parazit Derg*, 33(2), pp. 116-119.

- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E. & Gothe, R. (2000) Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol*, 89(3), pp. 241-248.
- Zanette, M. F., Lima, V. M., Laurenti, M. D., Rossi, C. N., Vides, J. P., Vieira, R. F., Biondo, A. W. & Marcondes, M. (2014) Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop*, 47(1), pp. 105-107.
- Zemtsova, G., Killmaster, L. F., Mumcuoglu, K. Y. & Levin, M. L. (2010) Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol*, 52(4), pp. 383-392.
- Zhang, H., Zhao, J., Wang, P. & Qiao, Z. (2001) Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res*, 87(8), pp. 674-676.
- Zhu, Y., Fournier, P. E., Ereemeeva, M. & Raoult, D. (2005) Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol*, 5, 11.
- Živičnjak, T., Martinkovic, F. & Beck, R. (2007) Canine dirofilariosis in Croatia: Let's face it. *First European Dirofilaria Days, 22-25 Feb 2007, Zagreb, Croatia, Abstr.*, p.35.
- Zivcnjak, T., Martinkovic, F., Khoury, C., Bongiorno, G., Bosnić, S., Lukacevic, D. & Maroli, M. (2011) Serological and entomological studies of canine leishmaniosis in Croatia. *Veterinarski Arhiv*, 81, pp. 99-110.
- Živičnjak, T., Martinković, F., Marinculić, A., Mrljak, V., Kučer, N., Matijatko, V., Mihaljević, Ž. & Barić-Rafaj, R. (2005) A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131(1-2), pp. 35-43.

## IX. ANHANG

### 1. Material

#### 1.1. Geräte

Thermomixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nano Drop ND-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
AB-7500-Real-Time PCR Gerät	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
AB-7500 FAST Real Time PCR System	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gelkammern verschiedener Größen	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Geldokumentationssystem (UV-Licht)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektrophoresis Powersupply EPS 301	Amersham Biociences, Freiburg, Deutschland
ELISA-Reader (LEDetect 96)	Deelux Labortechnik, Gödensdorf, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop (495nm)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

#### 1.2. Kits

QIAamp DNA MiniKit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HotStarTaqPlus DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
MegaScreen® FLUOTOXOPLASMA g	MegaCor, Hörbranz, Austria
MegaScreen® FLUONEOSPORA c.	MegaCor, Hörbranz, Austria
MegaScreen® FLUORICKETTSIA con.,	MegaCor, Hörbranz, Austria
MegaScreen® FLUOANAPLASMA ph.,	MegaCor, Hörbranz, Austria
MegaScreen® FLUOBABESIA c.,	MegaCor, Hörbranz, Austria
MegaScreen® FLUOEHRlichia c	MegaCor, Hörbranz, Austria
DiroCHECK® canine Heartworm Antigen Test Kit	Synbiotics Corp., San Diego, USA
Canine Spotted Fever Rickettsia EIA IgG Antibody Kit	Fuller Laboratories, Fullerton, USA

**1.3. Nukleotide, Primer, Polymerasen**

dNTP- Mix	5Prime, Hamburg, Deutschland
Primer und Sonden (Tab. 12, 13)	Eurofins genomics, Ebersberg, Deutschland
Applied Biosystems Gene Expression Assay Mix Ecanis 30-ANY	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Universal fast TaqMan MasterMix	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
HotStarTaqPlus DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
HotMaster Taq DNA Polymerase	5Prime, Hamburg, Deutschland
Hot Master Taq DNA Polymerase 10 x buffer	5Prime, Hamburg, Deutschland

**1.4. Chemikalien**

Molekularbiologisch reines H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich®Chemie,München, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$ , reinst	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (ultra pure quality)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TAE Electrophoresis Puffer (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gel Red <sup>TM</sup> Nucleid Acid stain, 10.000x in Wasser	Biotium Hayward, USA
6x Gel-loading-Puffer 100bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
1% Evans Blau	Sigma-Aldrich®Chemie,München, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCL	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Roth®, Karlsruhe, Deutschland

**1.5. Verbrauchsmaterial**

Safe-Lock Reaktionsgefäße, 1,5 ml, PCR clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Platten	nerbe plus, Wingen a. d. Luhr, Deutschland
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Durchstechbare Aluminiumfolie	Neolab, Heidelberg, Deutschland
MicroAmp optical adhesive film	Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen für PCR, certified RNase DNase pyrogen DNA free	nerbe plus, Wingen a.d. Luhr, Deutschland
Pipettenspitzen für Serologie	Kikser Biotech, Steinfurt, Deutschland
Deckgläser	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Objektträgerplättchen	Roth®, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotiterplatten, PS-Microplate 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA

**1.6. Sonstiges**

Anti-Dog IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in rabbits	Sigma-Aldrich® Chemie, München, Deutschland
MegaScreen®Flouvet® FITC Mounting Medium	MegaCor, Hörbranz, Österreich
Mikro Win 2010	Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland



## **X. DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich

- ganz besonders und allen voran bei Priv.-Doz. Dr. Cornelia Silaghi, die mir ermöglicht hat, eine Arbeit über diese interessante Thematik zu verfassen. Dabei unterstützte sie mich mit unglaublich viel Engagement und Fachkompetenz beim Erstellen und Korrigieren meiner Arbeit und stand mir zu jeder Zeit mit viel Geduld motivierend zur Seite.
- bei Enstela Shukullari für die äußerst gewissenhafte Blutprobenentnahme und Datenerfassung in Albanien, die es mir ermöglicht hat gleich mit der Analyse der Proben zu beginnen und mir dadurch sehr viel Arbeit abgenommen hat. Außerdem konnte ich mich bei Rückfragen immer auf eine schnelle und ausführliche Antwort verlassen.
- bei Claudia Thiel für die zuverlässige Verwaltung der für diese Studie notwendigen Materialien und die große Hilfe bei der Durchführung der PCRs.
- bei dem Diagnostiklabor des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, insbesondere bei Andrea Mihalkov und Ute Maurer, die mir sehr bei der Durchführung der serologischen Untersuchungen und deren Auswertungen geholfen haben.
- bei Priv.-Doz. Dr. Sven Reese für die sehr geduldige, freundliche und intensive Beratung und Erstellung der statistischen Analyse meiner Daten.
- bei Priv.-Doz. Dr. Dr. Steffen Rehbein für das Korrekturlesen meines Manuskripts und der Hilfe bei der Literaturrecherche zu schwer zugänglichen osteuropäischen Studien.

- bei meinem Freund Dr. Christian Meineck, der immer für mich da war und mir bei jeglichen Computerproblemen mit viel Geduld helfend zur Seite stand.
- bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir auch insbesondere durch das Korrekturlesen dieser Arbeit eine riesengroße Hilfe waren.